

METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING**Publication number:** JP6505625 (T)**Publication date:** 1994-06-30**Inventor(s):** ERLICH HENRY A [US]; BEGOVICH ANN B [US]; BUGAWAN TEODORICA [US]; GRIFFITH ROBERT L [US]; SCHARF STEPHEN J [US]; APPLE RAYMOND J [US]**Applicant(s):** HOFFMANN LA ROCHE [CH]**Classification:****- international:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68**- European:** C12Q1/68M4**Application number:** JP19920502862T 19911206**Priority number(s):** US19900623098 19901206; WO1991US09294 19911206**Also published as:**

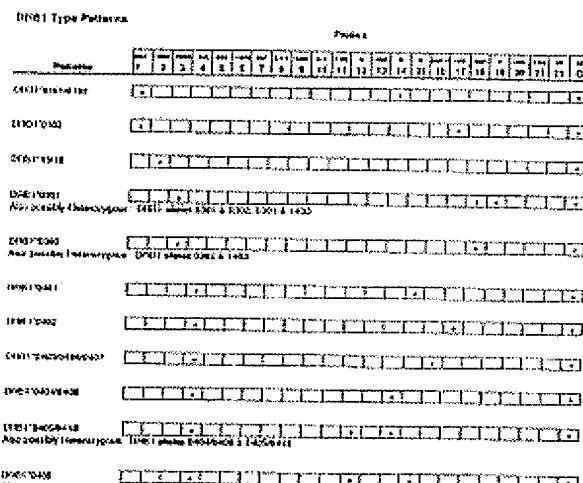
- JP3643375 (B2)
- WO9210589 (A1)
- ES2115667 (T3)
- EP0514534 (A1)
- EP0514534 (B1)
- DK514534 (T3)
- DE69129192 (T2)
- CA2075037 (A1)
- CA2075037 (C)
- AU9136191 (A)

<< less

Abstract not available for JP 6505625 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9210589 (A1)**

Primers for amplification of specific nucleic acid sequences of the second exon of HLA DRbeta genes and probes for identifying polymorphic sequences contained in the amplified DNA can be used in processes for typing homozygous or heterozygous samples from a variety of sources and for detecting allelic variants not distinguishable by serological methods. This HLA DRbeta DNA typing system can be used in a dotblot format that is simple and rapid to perform, produces detectable signals in minutes, and can be used for tissue typing, determining individual identity, and identifying disease susceptible individuals.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

Family list

Approximately 341 application(s) for: JP6505625 (T)

1 Probe groups for the detection of nucleotide variations and genetic polymorphisms.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY ; SAIKI RANDALL KEICHI (+2)
EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)
Publication info: AT73502 (T) — 1992-03-15

Applicant: CETUS CORP [US]
IPC: C07K14/74; C12Q1/68; C07K14/435; (+3)

2 Means for amplifying nucleic acid sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS
EC: B01L7/00D; C12Q1/68D4
Publication info: AT83505 (T) — 1993-01-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: B01L7/00; C12Q1/68; C40B40/06; (+9)

3 Kit for use in amplifying and detecting nucleic acid sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS ; ARNHEIM NORMAN (+4)
EC: B01L7/00D; C07K14/805; (+3)
Publication info: AT84822 (T) — 1993-02-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: B01L7/00; C07K14/805; C12N15/10; (+13)

4 CHARACTERIZATION AND DETECTION OF SEQUENCES ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; HORN GLENN T [US]
EC: C12Q1/68M6; C07K14/705B28; (+1)
Publication info: AT106454 (T) — 1994-06-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: G01N33/53; A61K38/00; A61K39/395; (+19)

5 Process for detecting specific nucleotide variations and genetic polymorphisms present in nucleic acids and kits therefor.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US] ; SAIKI RANDALL KEICHI [US] (+2)
EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)
Publication info: AT125307 (T) — 1995-08-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; C07K14/74; C12Q1/68; (+6)

6 Detection of viruses by amplification and hybridization.

Inventor: SNINSKY JOHN JOSEPH [US] ; KWOK SHIRLEY LEE [US] (+1)
EC: C12Q1/70B6; C12Q1/70; (+1)
Publication info: AT127857 (T) — 1995-09-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/569; (+7)

7 PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME

Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; STOFFEL SUSANNE [US] (+2)
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)
Publication info: AT135741 (T) — 1996-04-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; C11D3/386; C12N1/21; (+15)

8 METHOD FOR HLA DP TYPING

Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; HORN GLENN T [US] (+2)
EC: C12Q1/68M4
Publication info: AT140035 (T) — 1996-07-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; A61K39/00; A61K49/00; (+14)

9 HIGH TEMPERATURE REVERSE TRANSCRIPTASES

Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; MYERS THOMAS W [US]
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)
Publication info: AT151112 (T) — 1997-04-15

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; C12N9/12; C12Q1/68; (+5)

10 Apparatus and method for performing automated amplification of nucleic acid sequences and assays using heating and cooling steps.

Inventor: JOHNSON LARRY JAMES [US] ; LEATH RICHARD ALAN [US] (+4)
EC: C07H21/00C4; B01J19/00C; (+1) Applicant: PERKIN ELMER CORP [US]
IPC: C12N15/09; B01J19/00; B01L7/00; (+23)

Publication info: AT152529 (T) — 1997-05-15

11 Purified thermostable enzyme and process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using said enzyme.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US] ; HORN GLENN [US] (+5)
EC: C12P19/34; C12N9/12B7B7; (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N9/12; C12N9/96; C12N15/09; (+14)

Publication info: AT154072 (T) — 1997-06-15

12 METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING

Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; BEGOVICH ANN B [US] (+4)
EC: C12Q1/68M4 Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7); C12Q1/68

Publication info: AT164630 (T) — 1998-04-15

13 Process for amplifying nucleic acid sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS [US] EC: C12N15/10; B01L7/00D; (+2) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; B01L7/00; C07K14/805; (+14)

Publication info: AT165869 (T) — 1998-05-15

14 RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION**METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA**

Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; LAWYER FRANCES C [US] (+1)
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; C07H21/04; C12N1/21; (+16)

Publication info: AT169337 (T) — 1998-08-15

15 THE REDUCTION OF NON-SPECIFIC AMPLIFICATION DURING IN VITRO NUCLEIC ACID AMPLIFICATION USING MODIFIED NUCLEIC ACID BASES

Inventor: SNINSKY JOHN J [US] ; GELFAND DAVID H [US] (+1)
EC: C12N9/12B7B49; C12Q1/68D2A; (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N9/00; C12N9/12; C12N15/09; (+10)

Publication info: AT176002 (T) — 1999-02-15

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-505625

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月30日

(51)Int.Cl.
C 12 Q 1/68

識別記号 席内整理番号
A 7823-4B

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21)出願番号 特願平4-502862
(36) (22)出願日 平成3年(1991)12月6日
(35)翻訳文提出日 平成4年(1992)8月6日
(36)国際出願番号 PCT/US91/09294
(37)国際公開番号 WO92/10589
(38)国際公開日 平成4年(1992)6月25日
(31)優先権主張番号 623,098
(32)優先日 1990年12月6日
(33)優先権主張国 米国(US)
(38)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
L, SE), AU, CA, JP, US

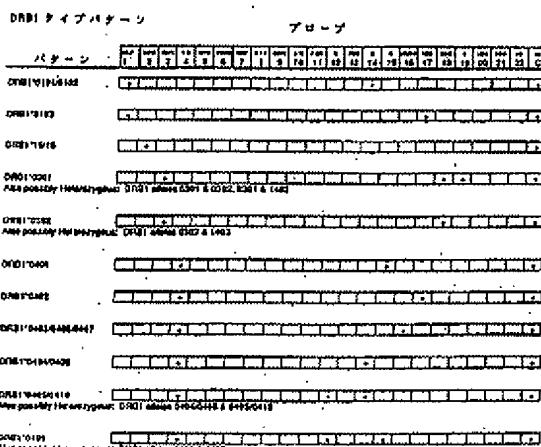
(71)出願人 エフ. ホフマン - ラ ロシュ アーゲ
スイス国シエイチ-4002 バーゼル グ
レンツアーヘルストラッセ 124
(72)発明者 アーリッヒ, ヘンリー エイ.
アメリカ合衆国94602 カリフォルニア州
オークランド, ローダ アベニュー 3936
(72)発明者 ベゴビッチ, アン ピー.
アメリカ合衆国94350 カリフォルニア州
エル セリト, ロックウェイ アベニュー
7306
(74)代理人 弁理士 深村 哲 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HLA DR β のDNAタイピングのための方法および試薬

(57)【要約】

HLA DR β 遺伝子第二エクソンの特異的核酸配列の増幅用プライマーおよびその増幅されたDNA中に含有される多形配列の同定用プローブを、様々な起源のホモ接合体またはヘテロ接合体サンプルの型の判定および血清学的方法では識別できない対立遺伝子変異体の検出に使用できる。このHLA DR β DNAの型判定システムは、実施が迅速かつ簡便で、分単位で検出可能なシグナルを生成するドットプロットフォーマットに使用でき、組織の型の判定、個体の同一性の決定、および疾患への感受性の同定に応用できる。



特表平6-505625 (2)

請求の範囲

1. サンプル中の核酸のORF DNA型を決定するための方法において、
 - (a) ORF 遺伝子第二エクソンを含有するサンプル中の任意の核酸を増幅し、
 - (b) 工程 (a) で増幅された上記核酸を第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、
 - (c) ORF 遺伝子第二エクソンの配列を含有するサンプル中の核酸の特異的サブセットを増幅し、
 - (d) 工程 (c) で増幅された上記核酸を第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、ついで
 - (e) 工程 (b) および (d) におけるプローブハイブリダイゼーションのパターンからサンプル中のORF DNAの由来するORF 遺伝子型を決定する、

工程からなる方法
2. 工程 (a) および (c) の増幅は、一对のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応によって行い、工程 (d) において用いられるプライマー一对は工程 (c) において用いられるプライマー対とは異なる「請求項1」記載の方法
3. 工程 (a) において用いられるプライマーは GH46 および GH50 であり、工程 (c) において用いられるプライマーは GH46 および CRX37 または GH46 および CRX30 のいずれかである「請求項2」記載の方法
4. オリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルはそれぞれ2種類または2種以上のプローブからなり、これらのプローブはORF 遺伝子第二エクソン配列にハイブリダイズし、これらの配列はアミノ酸残基9～16、アミノ酸残基25～34、アミノ酸残基67～74、およびアミノ酸残基88をコードする配列からなる群より選ばれる「請求項3」記載の方法
5. オリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルは、プローブ CRX60 (SEQ ID NO:79), GH105 (SEQ ID NO:91), GH104 (SEQ ID NO:80), GH59 (SEQ ID NO:57), CRX68 (SEQ ID NO:61), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX36 (SEQ ID NO:

71), CRX48 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX4 (SEQ ID NO:70), CRX04 (SEQ ID NO:80), GH66 (SEQ ID NO:89), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項4」記載の方法

6. オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルは、プローブ GH125 (SEQ ID NO:84), CRX50 (SEQ ID NO:68), CRX53 (SEQ ID NO:78), CRX15 (SEQ ID NO:64), CRX82 (SEQ ID NO:81), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX61 (SEQ ID NO:80), GH54 (SEQ ID NO:88), CRX58 (SEQ ID NO:77), CRX57 (SEQ ID NO:78), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項4」記載の方法

7. 工程 (c) において用いられるプライマーは GH46 (SEQ ID NO:67) および GH60 (SEQ ID NO:68) であり、工程 (d) において用いられるプライマーは GH46 および CRX37 (SEQ ID NO:73) であり、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブ CRX60 (SEQ ID NO:79), GH105 (SEQ ID NO:91), GH104 (SEQ ID NO:80), GH59 (SEQ ID NO:57), CRX68 (SEQ ID NO:61), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX04 (SEQ ID NO:80), GH66 (SEQ ID NO:86), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなり、オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルは、プローブ GH125 (SEQ ID NO:84), CRX60 (SEQ ID NO:83), CRX53 (SEQ ID NO:78), CRX16 (SEQ ID NO:84), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX61 (SEQ ID NO:80), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX68 (SEQ ID NO:77), CRX57 (SEQ ID NO:78), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる「請求項4」記載の方法

8. オリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルは固体支持体に固定し、各プローブは上記支持体上の分離した別個の位置に配置させる「請求項1」記載の方法

9. 工程 (a) および工程 (c) において用いられるプライマー、ならびにオリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルからなる「請求項2」記載の方法を実施するためのキット

10. プライマー GH46 (SEQ ID NO:67)、GH60 (SEQ ID NO:68)、および CRX37

(SEQ ID NO:73)、プローブ CRX60 (SEQ ID NO:79), GH105 (SEQ ID NO:97), GH104 (SEQ ID NO:80), GH59 (SEQ ID NO:67), CRX68 (SEQ ID NO:80), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX04 (SEQ ID NO:80), GH66 (SEQ ID NO:86), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ならびにプローブ GH125 (SEQ ID NO:94), CRX50 (SEQ ID NO:68), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX16 (SEQ ID NO:84), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX69 (SEQ ID NO:82), CRX61 (SEQ ID NO:80), GH64 (SEQ ID NO:85), CRX68 (SEQ ID NO:77), CRX67 (SEQ ID NO:78), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項9」記載のキット

11. プライマー GH46 (SEQ ID NO:67), GH60 (SEQ ID NO:68)、および CRX37 (SEQ ID NO:73)、プローブ CRX60 (SEQ ID NO:79), GH105 (SEQ ID NO:91), GH104 (SEQ ID NO:80), GH59 (SEQ ID NO:57), CRX68 (SEQ ID NO:61), CRX08 (SEQ ID NO:65), GH122 (SEQ ID NO:89), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX04 (SEQ ID NO:80), GH58 (SEQ ID NO:88), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブ、ならびにプローブ GH125 (SEQ ID NO:84), CRX50 (SEQ ID NO:68), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX16 (SEQ ID NO:80), CRX60 (SEQ ID NO:81), CRX69 (SEQ ID NO:82), CRX61 (SEQ ID NO:80), GH54 (SEQ ID NO:86), CRX68 (SEQ ID NO:77), CRX67 (SEQ ID NO:78), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブからなる「請求項10」記載のキット

12. サンプルが OR1, OR2, OR4, OR7, OR9、および OR10 タイプからなる群より選ばれる即清型の OR01 対立遺伝子からの核酸からなるか否かを決定する方法において、

(a) サンプル中のORF 構造を増幅し、ついで
 (b) 工程 (a) で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、この場合上記プローブは OR01 遺伝子第二エクソンのアミノ酸残基9～16をコードする独特の多形配列はハイブ

リダイスする方法

13. 増幅工程はプライマー GH46 および GH50 のポリメラーゼ連鎖反応によって行い、プローブのパネルは CRX60 (SEQ ID NO:78), GH105 (SEQ ID NO:91), GH104 (SEQ ID NO:80), GH59 (SEQ ID NO:57), CRX68 (SEQ ID NO:61), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:88), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX04 (SEQ ID NO:80), GH58 (SEQ ID NO:88), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ならびにプローブ GH125 (SEQ ID NO:94), CRX50 (SEQ ID NO:68), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX67 (SEQ ID NO:78), および CRX12 (SEQ ID NO:83)からなる「請求項12」記載の方法

14. サンプルが対立遺伝子 0101, 0102, 0103, 0301, 0302, 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0701, 0801, 0802, 0803, 0901, 1001, 1101, 1102, 1103, 1104, 1201, 1301, 1302, 1303, 1401, 1402, OR2, OR7, PEYR からなる群より選ばれる OR01 対立遺伝子からの核酸を含有するか否かを決定し、その核酸が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

(a) サンプル中のORF 構造を増幅し、ついで
 (b) 工程 (a) で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせる方法

15. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブ CRX04 (SEQ ID NO:80), CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX16 (SEQ ID NO:64), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), CRX60 (SEQ ID NO:60), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX66 (SEQ ID NO:77), CRX67 (SEQ ID NO:78), CRX60 (SEQ ID NO:70), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX68 (SEQ ID NO:84), GH54 (SEQ ID NO:85), GH58 (SEQ ID NO:88), GH89 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:81), GH111 (SEQ ID NO:82), GH122 (SEQ ID NO:83)、および GH125 (SEQ ID NO:94)からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項14」記載の方法

16. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブ CRX04 (SEQ ID NO:80), CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX16 (SEQ ID NO:64), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX48 (SEQ ID NO:74), CRX60 (SEQ ID NO:60), CRX63

特表平6-505625 (3)

(SEQ ID NO:76), CRX56 (SEQ ID NO:77), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX60 (SEQ ID NO:79), CRX61 (SEQ ID NO:80), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX68 (SEQ ID NO:84), GH54 (SEQ ID NO:85), GH58 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), GH122 (SEQ ID NO:93), および GH125 (SEQ ID NO:94) からなる「請求項15」記載の方法

17. サンプルの血清DR型を DR10w1, DR10w100, DR2, DR40w4, DR40w10, DR40w14, DR40w16, DR3, DRw11, DRw11-1, DRw11-2, DRw12, DRw13, DRw14 w16, DRw140w8, DR7, DRw8-1, DRw8-2, DR9, および DRw10 タイプからなる群より選ばれるその血清DR型を決定する方法において、

(a) サンプル中のDRB1抗原を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を越える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせる方法

18. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX05 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:76), CRX60 (SEQ ID NO:79), CRX63 (SEQ ID NO:82), GH56 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなる「請求項17」記載の方法

19. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX06 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:76), CRX60 (SEQ ID NO:79), CRX63 (SEQ ID NO:82), GH66 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなる「請求項17」記載の方法

20. AB54 (SEQ ID NO:61), AB82 (SEQ ID NO:52), AB83 (SEQ ID NO:58), DR829 (SEQ ID NO:95), DR8260 (SEQ ID NO:95), DR817 (SEQ ID NO:78), DR830 (SEQ ID NO:107), DR8152 (SEQ ID NO:220), CRX11 (SEQ ID NO:62), および CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプライマー

ID NO:144), DRB203 (SEQ ID NO:278), DRB183 (SEQ ID NO:239), DRB116 (SEQ ID NO:194), DRB02 (SEQ ID NO:81), DRB38 (SEQ ID NO:115), DRB222 (SEQ ID NO:286), DRB232 (SEQ ID NO:308), DRB138 (SEQ ID NO:212), DRB198 (SEQ ID NO:274), および DRB42 (SEQ ID NO:119) からなる「請求項2」記載の方法

25. サンプルが対立遺伝子0101, 0102, 0103, 1601, 1602, 1603, 1604, 1801, 1802, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0409, 0410, 0411, 1101, 1102, 1103, 1104, BUGS, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1401, 1402, 1403, 1405, 0701, 0801, 0802, 0803, 0804, 0901, 1001, 1201, および 1202 からなる群より選ばれる DR81 対立遺伝子からの核酸を含有するか否かを決定し、その構成が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

(a) サンプル中のDRB1抗原を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を越える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせる方法

28. 第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブは、CRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:80), GH66 (SEQ ID NO:68), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX61 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX60 (SEQ ID NO:84), CRX82 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

27. 第二のプローブのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブがなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:90), DRB63 (SEQ ID NO:140), DRB13 (SEQ ID NO:189), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX60 (SEQ ID NO:77), DRB189 (SEQ ID NO:272), DRB197 (SEQ ID NO:273), DRB215 (SEQ ID NO:291), および DRB216 (SEQ ID NO:292); CRX60 (SEQ ID NO:79), GH126 (SEQ ID NO:94), DRB180 (SEQ ID NO:288), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX61 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX68 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX68 (SEQ ID NO:77), CRX58 (SEQ ID NO:77), および GH68 (SEQ ID NO:86); CRX81 (SEQ ID NO:84), CRX08 (SEQ ID NO:78), CRX65 (SEQ ID NO:78), CRX04 (SEQ ID NO:60); CRX81 (SEQ ID NO:84), CRX08 (SEQ ID NO:87), および CRX33 (SEQ ID NO:69), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DRB181 (SEQ ID NO:257), CRX50 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

21. DRB18 (SEQ ID NO:97), DRB20 (SEQ ID NO:89), DRB21 (SEQ ID NO:89), DRB27 (SEQ ID NO:106), DRB31 (SEQ ID NO:108), DRB32 (SEQ ID NO:108), DRB33 (SEQ ID NO:110), DRB34 (SEQ ID NO:111), DRB35 (SEQ ID NO:112), DRB38 (SEQ ID NO:113), DRB37 (SEQ ID NO:114), DRB42 (SEQ ID NO:119), DRB46 (SEQ ID NO:122), DRB48 (SEQ ID NO:123), DRB49 (SEQ ID NO:125), DRB60 (SEQ ID NO:149), DRB84 (SEQ ID NO:160), DRB90 (SEQ ID NO:186), DRB91 (SEQ ID NO:167), DRB95 (SEQ ID NO:171), DRB100 (SEQ ID NO:176), DRB101 (SEQ ID NO:177), DRB102 (SEQ ID NO:178), DRB103 (SEQ ID NO:179), DRB107 (SEQ ID NO:189), DRB108 (SEQ ID NO:184), DRB109 (SEQ ID NO:185), DRB112 (SEQ ID NO:186), DRB113 (SEQ ID NO:189), および DRB118 (SEQ ID NO:184) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプローブ

22. 第一のパネルのプローブは、DRB01 (SEQ ID NO:79), GH104 (SEQ ID NO:80), DRB48 (SEQ ID NO:123), DRB48 (SEQ ID NO:126), DRB207 (SEQ ID NO:283), GH102 (SEQ ID NO:88), DRB208 (SEQ ID NO:285), DRB20 (SEQ ID NO:89), DRB102 (SEQ ID NO:178), DRB112 (SEQ ID NO:188), DRB07 (SEQ ID NO:84), および DRB42 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

23. 第二のパネルのプローブは、DRB223 (SEQ ID NO:229), DRB37 (SEQ ID NO:144), DRB203 (SEQ ID NO:278), DRB163 (SEQ ID NO:239), DRB118 (SEQ ID NO:184), DRB02 (SEQ ID NO:81), DRB38 (SEQ ID NO:116), DRB222 (SEQ ID NO:298), DRB232 (SEQ ID NO:308), DRB198 (SEQ ID NO:212), DRB198 (SEQ ID NO:274), および DRB42 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

24. 工程 (a)において用いられるプライマーは CRX28 (SEQ ID NO:67) および CRX29 (SEQ ID NO:88) であり、工程 (c)において用いられるプライマーは CRX28 および CRX37 (SEQ ID NO:73) であり、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブDRB01 (SEQ ID NO:79), GH104 (SEQ ID NO:80), DRB46 (SEQ ID NO:123), DRB48 (SEQ ID NO:126), DRB207 (SEQ ID NO:283), GH102 (SEQ ID NO:88), DRB209 (SEQ ID NO:285), DRB20 (SEQ ID NO:89), DRB102 (SEQ ID NO:179), DRB112 (SEQ ID NO:189), DRB07 (SEQ ID NO:84), および DRB42 (SEQ ID NO:119) からなり、オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルはプローブDRB223 (SEQ ID NO:229), DRB37 (SEQ ID NO:144)

CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX68 (SEQ ID NO:77), GH59 (SEQ ID NO:87), および CRX33 (SEQ ID NO:88), CRX04 (SEQ ID NO:80), CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX57 (SEQ ID NO:78), DRB181 (SEQ ID NO:267), CRX61 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項1」記載の方法

28. 工程 (a)において用いられるプライマーは CRX46 (SEQ ID NO:67) および GH50 (SEQ ID NO:88) であり、工程 (c)において用いられるプライマーは AB83 (SEQ ID NO:59) と AB80 (SEQ ID NO:67), AB82 (SEQ ID NO:58) と AB80, AB84 (SEQ ID NO:68) と AB80, および CRX48 (SEQ ID NO:67) と CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれ、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブCRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:80), GH50 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:88), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX01 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:68), CRX08 (SEQ ID NO:81), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX02 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなり、第二のパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる 2 種またはそれ以上のプローブからなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:90), DRB63 (SEQ ID NO:140), DRB13 (SEQ ID NO:189), DRB189 (SEQ ID NO:272), DRB197 (SEQ ID NO:273), DRB215 (SEQ ID NO:291), および DRB216 (SEQ ID NO:292); CRX60 (SEQ ID NO:79), GH126 (SEQ ID NO:94), DRB180 (SEQ ID NO:288), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX61 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX68 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60); CRX81 (SEQ ID NO:84), CRX08 (SEQ ID NO:87), および CRX33 (SEQ ID NO:69), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DRB181 (SEQ ID NO:257), CRX50 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

明細書

HLA DRB の DNA タイピングのための方法および試薬

既報出願の相違要旨

本出願は、1988年3月13日出願の現在は放棄された一連番号第 830,331号の一部継続出願である。1988年8月22日出願の現在は放棄された一連番号第 889,344 号の一部継続出願である。1989年8月16日出願、係属中の一連番号第 491,210号の一部継続出願である。1990年12月6日出願、係属中の一連番号第 823,098号の一部継続出願であり、上記各出願は参考として本明細書に導入される。

発明の分野

本発明は、HLA DRB (DR) 検出の DNA タイピングのための方法および試薬に関するものである。本発明は、RNA または cDNA 錄型からなるサンプルを含めた各種起源のホモ接合またはヘテロ接合サンプルのタイピング、および現在の血清学的、免疫学的、もしくは生化学的方法では識別できない対立遺伝子の検出を可能にする。本発明のタイピング系は、移植組織のタイピング、個体の同一性の決定、および疾患に罹患しやすい個体の同定を容易にする。したがって、本発明は、一般的に医学の分野、とくに医学的研究および診断の領域、法科学の分野、ならびに分子生物学の分野に応用される。

関連技術の説明

HLA クラス II 蛋白質 HLA DR, HLA DQ、および HLA DP は、ヒト染色体 6 の短腕上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の連鎖子によってコードされている。クラス II 蛋白質は、約 34kDa の鎖および約 29kDa の鎖からなるヘテロダイマー蛋白質である。クラス II 蛋白質は、マクロファージ、巨核細胞、活性化 T 細胞、および他の細胞タイプの表面上に表現し、抗原の結合およびヘルペス・リソウスへの提供に関与する (Giles & Cope: Structure, function and genetics of the Human Class II molecules. *Adv. Immunol.* 37: 1, 1985 参照)。さらに、クラス II 蛋白質は、成熟 T リンパ球に発現した T 细胞受容体のレバートリーを決定することにより、特異的免疫応答に影響する。HLA クラス II 連鎖子および蛋白質の一般的な総説には、Trowsdale ら: "Structure, sequence and polymorphism in the HLA D region",

Immunol. Rev. 85: 5 (1985) がある。

クラス II α および β 鎮は別の連鎖子によってコードされ、DP, DQ、および DR 連鎖子はその MHC の別の領域に位置する。DR 領域では、單一の DR 連鎖子座、または連鎖子は非多形 DR 鎮をコードするが、DRB1, DRB2 (DRB8 ともいわれる), DRB3, DRB4、および DRB5 と命名されたうちの異なる DR 連鎖子座が多形 DR 鎮をコードする。一部の連鎖子座はある種のハロタイプ上にのみ存在し (たとえば DR2 ハロタイプ上 DRB5)、さらに発現される DR 連鎖子の数もハロタイプで変動する (Bohmer: HLA-DR beta genes vary in number between different DR-specificities, whereas the number of DR beta genes is constant. *J. Immunol.* 135: 2148, 1985 参照)。

同定された明らかに異なる DRB1 対立連鎖子の数は増加を続けている。HLA 系図子についての WHO 命名委員会からの 1989 年報告では、34 の DRB1 対立連鎖子が同定された。これらの対立連鎖子によって、血清学的 DR 特異性 DR1～DRw18 が観測されるものと考えられている (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system 1989" と題する文献, *Immunogenetics* 31: 131-140, 1990 参照。参考として本明細書に導入する)。1990 年の報告までに、累積された DRB1 対立連鎖子の数は 45 にまで上った (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system 1990" と題する文献, *Immunogenetics* 33: 301-309, 1991 参照。参考として本明細書に導入する)。本発明は、数種の新たに見出された対立連鎖子の配列を提供するものである。

DRB2 連鎖子座 (現在は DRB2 連鎖子座と呼ばれる) の対立連鎖子は、DR1, DR2、および DRw10 ハロタイプ上に存在し、見掛け上発現されない (Erlach ら: Analysis of isotypic and allotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments. "Immunology of HLA", DuPont 編, Springer-Verlag, New York, 1991 年刊参照)。

DRB3 連鎖子座の対立連鎖子は、スーパー・タイプ特異性 DRw62 (DRw52a, DRw52b、および DRw52c) をコードし、DR3, DRw11, DRw12, DRw13, DRw14, DRw17、ならびに DRw18 ハロタイプ上に存在する。

单一対立連鎖子を有する DRB4 連鎖子座は DRw53 スーパー・タイプ特異性をコードし、DR4, DR7、および DRw9 ハロタイプ上にのみ存在する (Natsuyama ら: Structural

relationships between the DRbeta1 and DRbeta2 subunits in DR4, 7, and w9 haplotypes and the DRw63 (DT3) specificity. *J. Immunol.* 137: 934, 1986 参照)。

DRB5 連鎖子座の対立連鎖子は DR2 ハロタイプ上にのみ存在する (Analysis of isotypic and allotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments. 前出)。

クラス II DR 供体 (蛋白質) の多形は現在、絶滅から得られたアロ血清を用い、精製リソーム上壁抗原蛋白質試験で分類されている。また、さらに細かい特異性によるタイピングを可能にし、アロ反応性 T 細胞クローンの特異性、または T 細胞培養液のホモ接合タイピングアッセイによる。成熟 T リンパ球 (HTC) による刺激に対する増殖応答に基づく、細胞タイピングプロトコールが開発されている。

これらの細胞ベースの分析では、さらに血清学的に認識される多くの抗原、たとえば DR の 6 つの DR サブタイプに分類される DR 特異性が定義される (Cairns ら: Sequence polymorphisms of HLA DR B 1 alleles relating to T cell recognized determinants. *Nature* 317: 168, 1985 参照)。しかしながら、血清学的および細胞生物学的アッセイ操作も困難で、時間がかかる。制限フランメント長多形 (RFLP) に基づく DNA タイピングプロトコールも発表されている (米国特許第 4,582,789 号参照。この記載は参考として本明細書に導入する)。しかしながら、これらの RFLP に基づく分析は大量の高分子量 DNA を必要とし、実験的な労力を要し、一方、毒性な利胆酵素の数が組まれていて、得られる結果に限界がある。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の出現は、複雑なゲノム DNA の分析および操作を容易にした。PCR 法は、核酸の鎖を複数の混合物に分離して、特異的な核酸の增幅を可能にし、米国特許第 4,883,195 号、4,883,202 号、4,888,818 号、および 4,895,188 号、ならびに欧州特許公報第 237,362 号に詳細に記載されている。これらの記載は参考として本明細書に導入する。

PCR 法はまた、個体のクラス II HLA DR のタイピングを容易にする。科学者らは、オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、これらのプライマーを興味のある配列の増幅に用いることにより、ゲノム DNA における DRB 連鎖子座の多形の第二エクソンを検討してきた (Scharf ら: *Hum. Immunol.* 22: 81, 1988 の "Sequence analysis of the HLA DRB and HLA DQB loci from three *Pemphigus vulgaris*

patients¹ と題する論文参照)。

PCR プライマーが制限酵素認識配列を含有する場合は、増幅されたDNAはシーケンシングベクターに直接クローン化することが可能で、増幅生成物の又クレオチド記列を容易に決定できる (Schartlら: Hum Immunol., 23:1078, 1988における "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence" と題する論文参照)。

増幅DNAはまた、配列特異的オリゴヌクレオチド(ssO)プローブを使用する検出方法によっても検討できる (Sakilら:Nature 324:18, 1986による "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA DR_B alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes" と題する論文参照)。

これらの進歩にもかかわらず、HLA DR_B 遺伝子の複雑さにより、個体のHLA DR_B DNAタイプを決定するための有益かつ効率的な手段の開発は妨げられてきた。本発明は、効率的かつ有益なHLA DR_B DNAタイピング法の要求に合致する新規な方法および試験を提供するものである。一方、これらの新規な方法および試験は、これまで知られていないかったDR_B 遺伝子座の発見をもたらし、さらにこれらの遺伝子座は本発明の方法によって分類、同定することができる。

本発明のタイピングシステムは、cDNAから合成されたcDNAのタイピング、ならびに組織、トランスジェニックシステム、病的状態および細胞系におけるDRB遺伝子の発現のタイピングおよび研究に使用できる。DR抗原を発現しないか、または異常な発現活性を示す細胞、たとえば腫瘍細胞も、容易にタイピングできる。しかも、異常な起源のサンプル、たとえば古代のDNA、や法医学サンプルで、DNAが分解しているか、さわめて微量しか分析に使用できなくても、型の判定が可能である。

PCRは標的DNAのフラグメントを百万倍にも増幅できるので、また本発明のシステムはPCR発生液を用いるので、放射標識プローブを使用する必要がなく、西洋ラビペルオキシダーゼ(HRP)に共有結合させた非局位元素SSOで十分な検出感度が得られる。本発明の特異的に結合した HRP標識プローブの存在は、発色性染料または化学発光性基質による単純なドットプロットフォーマットにより、分単位の速度で、検出できる。

発明の要約

図4は、DR4 血清学的特異性で細胞系をサブタイプに分類するための HLA DR_B DNA タイピング (例5参照) の結果を示す図であり、

図5は、DR3, DR6, DRw6 および DRw8 の特異性をサブタイプに分類するための HLA DR_B DNA タイピング (例6参照) の結果を示す図であり、

図6は、DRB 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例8参照) を表化したものであり、

図7は、多様の異なる細胞系のHLA DR_B DNA タイピング (例6および7参照) の結果を示す図であり、

図8は、DR3 細胞系のHLA DR_B DNA サブタイピング (例7参照) を示す図であり、

図9は、ヘテロ接合および他の異常なサンプルのHLA DR_B DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例7参照) を表化したものであり、

図10は、HLA DR_B DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものであり、

図11、12および13は、DR_B 対立遺伝子型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものである。

発明の詳細な説明

本発明は、HLA DR_B 型判定システム、および DR_B 対立遺伝子を分析するための配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ(SSO)を提供する。本発明は、cDNA構造を含む各種細胞からのヘテロ接合サンプルのタイピングに使用でき、また血清学的方法では識別できない対立遺伝子を具体的な検出に使用できる。このタイピングシステムは、実行が単純で迅速なドットプロットフォーマットを利用でき、検出可能なシグナルを分単位の速度で生成できることがで、組織のタイピングならびに個体の同一性および疾患への罹患しやすさの決定に応用が認められる。本発明は、HLA DR_B 対立遺伝子の検出および同定の方法を提供する。確認された明らかに異なるDRB1対立遺伝子の数は増加を続けている。WHO命名委員会からの1989年報告には、34のDRB1対立遺伝子を掲げられており、この対立遺伝子セットは、本項細書においては、以下1989対立遺伝子セットと呼ぶ。1990年の WHO命名委員会からの報告には46の対立遺伝子が掲げられ、この対立遺伝子セットは以下の1990対立遺伝子セットと呼ぶことにする。本発明は、さらに7個の新たに発見

された対立遺伝子の配列を提供する。

HLA クラスII遺伝子座で最も高度な多様性を示す DRB遺伝子座の多様性、および系図中でのこれらの遺伝子座における多数の対立遺伝子により、サンプル中の核酸が由来する特定の DRB遺伝子座および対立遺伝子の同定を困難にしている。本発明は、この決定を高い特異性をもって実現し、そのサンプルが採取された特徴の個体の同定を可能にする。さらに、この識別力は、本発明の法医学分野における応用を可能にするものである。

PCR(または他の増幅方法)を用いて少量のDNA(または分解DNAs)の増幅に使用することができる。本発明は、異常な起源、たとえば口腔粘膜、一茶の毛、また保存された古代の標本のDNAのようなサンプルからのHLA DR_B DNAの型の判定に使用できる。古代標本サンプルの場合には、古史以前起源のたとえば初期原人の対立遺伝子の分析が可能である。

PCR(または他の増幅方法)を用いて少量のDNA(または分解DNAs)の増幅に使用することができる。本発明は、異常な起源、たとえば口腔粘膜、一茶の毛、また保存された古代の標本のDNAのようなサンプルからのHLA DR_B DNAの型の判定に使用できる。古代標本サンプルの場合には、古史以前起源のたとえば初期原人の対立遺伝子の分析が可能である。

本発明の方法は、DR_B 遺伝子を発現しない細胞のDRB DNA 型の決定に使用できる。しかしながら、この方法はまた、DR_B mRNAから合成されたcDNAのDRB DNA 型の決定にも適用している。この方法は、様々な細胞または組織における HLA DR_B の表現の研究を容易にし、HLA DR_B 発現と形質転換、自己免疫、または他の健康状態に対する感受性との間に関連があるかどうかの決定に使用できる。

本発明の研究への利用可能性としては、直接的な臨床応用が明白である。WBCの遺伝子および遺伝子座は個体の免疫学的状態に中心的役割を果たし、特定のHLA 遺伝子座が疾患の抵抗性および感受性に関連している。本発明は、サンプル中のWBC DR_B 遺伝子座の測定を可能にし、本発明はまた、医学などに医学的診断方法の分野に応用できる。

このシステムの識別力は、拒絶または移植片対宿主病の危険を最小限にするために確実な性格な HLA DR_Bマッチングが必須と思われる移植ドナーの型の判定に有用である (Pell Jacklら: J Clin Immunol, 3:341, 1983における "Mixed lymphocyte reactions for individuals with phenotypic identity for specific HLAB DR determinants: The role of linkage disequilibrium and of specific DR and other Class II determinants" と題する論文参照)。疾患感受性に関する研究では、DR_B 対立遺伝子における单一の又クレオチドとの相違が医学的に重要であることが示されている (Schartlら, "Specific HLA-DRB and HLA-DRB alleles confer

特表平6-505625 (8)

susceptibility to *Pseudogus vulgaris*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:215, 1989 ならびに Report of "Identification of HLA-Dw14 genes in DRB1* Rheumatoid Arthritis". Lancet, 1992 年, 1989 参照)。

上述の利益に加えて、本発明はまた、以前には知られていなかつた DR 対立遺伝子を同定する方法、および関連プライマー、プローブ、ならびに DRB 対立遺伝子の同定方法を提供する。このタイピングシステムを使用する異常パターンの SEQ プローブハイブリダイゼーションでは、"Beutler" 細胞系の DNA タイピングによって表示されるように(例 7 参照)、新しい対立遺伝子が同定される。この細胞系は DRB1 遺伝子座において異常パターンのプローブハイブリダイゼーションを示し、現在は DRB1*103 [配列同定番号 (SEQ ID NO: 27)] と命名された、以前には報告されていなかった配列が明らかにされた。

同様にして、ライム病の患者の DRB1 対立遺伝子の本発明の分析で、新しいパターンのプローブハイブリダイゼーションが明らかにされた。DRB1 対立遺伝子配列は患者のゲノム DNA からクローニングされ、配列が決定された。患者の DRB1 対立遺伝子の配列は、これまでに報告されている DRB1 対立遺伝子とは異なり、新たに、DR*LY10' (また、DRB1*LY10') と命名された。その患者における他の対立遺伝子は DRB1*4042 であった。DR*LY10' 対立遺伝子は、5'-末端に、DRB1*4031, *4032, *4033、および *4034 に、そして 3'-末端に、*4031 に類似の配列の領域を有する。本発明は、DR*LY10' 対立遺伝子を他の DRB 対立遺伝子から識別するためのプローブを提供する。DR*LY10' 対立遺伝子は、現在は DRB1*1404 (SEQ ID NO: 40) と命名されている。

他の新たに発見された DRB1 遺伝子座の DRB1 対立遺伝子は、最初は DR*PEV' と命名された DRB1*1305 (SEQ ID NO: 30), DRB1*1303 (SEQ ID NO: 34)、および最初は DRB1*80GS と命名された DRB1*1105 (SEQ ID NO: 29) である。いずれも、本発明の方法による分析が新たなパターンのプローブハイブリダイゼーションを明らかにした場合に発見された。ついで各対立遺伝子を配列分析を行ったところ、新規なハイブリダイゼーションパターンを生じる配列変異が明らかにされた。本発明は、新たに発見された対立遺伝子を他の DRB 対立遺伝子から識別するためのプライマーおよびプローブを提供する。

本発明はまた、本発明の DRB タイピング法の実施をより便利にするためのキットを提供する。

トを提供する。一種のキットは、増幅およびタイピングの両試薬を包含する。他のキットは、本発明の 1 種または 2 種以上の DRB プローブのみを包含する。いずれのキットにおいても、プローブは標識されていてもされなくてても、または固体支持体に結合されていてもよい。プライマーをキット中に入れる場合は、検出を容易にするため、すなわち、シグナル発生試薬の結合または固定化のために標識することができる。キットにはまた、プローブハイブリダイゼーションを容易にするための試薬、すなわち染色性基質剤、およびストレプトアビジン複合西洋ワセビペルオキシダーゼを含むことができる。要約すれば、本発明の方法の実施に有用な試薬は、本発明の利用を促進する任意の配置でパッケージできる。

各対立遺伝子の第二のエクソンのヌクレオチド配列は、コードされるアミノ酸配列とともに、配列構成部に示す。以下の表 1 および 2 には、1988 対立遺伝子セットにおける対立遺伝子の相当するヌクレオチド配列情報を、比較が容易な様式で掲げる。表 1 にはまた、対立遺伝子 DRB1*101 の構成配列、ならびにコードされるアミノ酸配列を三文字および一文字の簡コードで示す。同様に、表 3 には、相当するアミノ酸配列情報を一文字コードで示す。各対立遺伝子の配列同定番号 (SEQ ID NO) を以下に示す。DRB1*1603, DRB1*1033、および DRB1*1105 を除き、すべての対立遺伝子は、1990 年 WHO 命名委員会報告 (上記、1990 対立遺伝子セット) に掲載されている。DRB1*1603 の配列については、Desopoulos ら: Hum. Immunol. 30:41-44, 1991 も参照されたい。

表 1、2 および 3 に掲載されない対立遺伝子のヌクレオチド配列は、配列構成部のほかに、以下の表 4 に掲げる。

対立遺伝子	SEQ ID NO:	対立遺伝子	SEQ ID NO:
DRB1*1011;	SEQ ID NO: 1	DRB1*1201;	SEQ ID NO: 30
DRB1*1012;	SEQ ID NO: 2	DRB1*1202;	SEQ ID NO: 31
DRB1*1013;	SEQ ID NO: 3	DRB1*1301;	SEQ ID NO: 32
DRB1*1301;	SEQ ID NO: 4	DRB1*1302;	SEQ ID NO: 33
DRB1*1302;	SEQ ID NO: 5	DRB1*1303;	SEQ ID NO: 34
DRB1*1303;	SEQ ID NO: 6	DRB1*1304;	SEQ ID NO: 35
DRB1*1401;	SEQ ID NO: 7	DRB1*1305;	SEQ ID NO: 36
DRB1*1402;	SEQ ID NO: 8	DRB1*1401;	SEQ ID NO: 37
DRB1*1403;	SEQ ID NO: 9	DRB1*1402;	SEQ ID NO: 38
DRB1*1404;	SEQ ID NO: 10	DRB1*1403;	SEQ ID NO: 39
DRB1*1405;	SEQ ID NO: 11	DRB1*1404;	SEQ ID NO: 40
DRB1*1406;	SEQ ID NO: 12	DRB1*1405;	SEQ ID NO: 41
DRB1*1407;	SEQ ID NO: 13	DRB1*1501;	SEQ ID NO: 42
DRB1*1408;	SEQ ID NO: 14	DRB1*1502;	SEQ ID NO: 43
DRB1*1409;	SEQ ID NO: 15	DRB1*1503;	SEQ ID NO: 44
DRB1*1410;	SEQ ID NO: 16	DRB1*1601;	SEQ ID NO: 45
DRB1*1411;	SEQ ID NO: 17	DRB1*1602;	SEQ ID NO: 46
DRB1*1701;	SEQ ID NO: 18	DRB2*0101;	SEQ ID NO: 47
DRB1*1801;	SEQ ID NO: 19	DRB3*0101;	SEQ ID NO: 48
DRB1*1802;	SEQ ID NO: 20	DRB3*0201;	SEQ ID NO: 49
DRB1*1803;	SEQ ID NO: 21	DRB3*0202;	SEQ ID NO: 516
DRB1*1804;	SEQ ID NO: 22	DRB3*0301;	SEQ ID NO: 50
DRB1*1901;	SEQ ID NO: 23	DRB4*0101;	SEQ ID NO: 51
DRB1*1001;	SEQ ID NO: 24	DRB5*0101;	SEQ ID NO: 52
DRB1*1101;	SEQ ID NO: 25	DRB5*0102;	SEQ ID NO: 53
DRB1*1102;	SEQ ID NO: 26	DRB5*0201;	SEQ ID NO: 54
DRB1*1103;	SEQ ID NO: 27	DRB5*0202;	SEQ ID NO: 55
DRB1*1104;	SEQ ID NO: 28	"	"
DRB1*1105;	SEQ ID NO: 29	"	"

以下の表 1、2 および 3 では、最近開拓された "PEV" および "LY10" 対立遺伝子を除いて、すべての配列は、上述の 1990 年 WHO 命名委員会報告に掲載されていて、DRB1*1011 ヌクレオチド配列はコンセンサス配列として示す。コンセンサス配列についての推定アミノ酸配列はヌクレオチド配列の上部に一および三文字コードで記載する。配列ホモロジーは横線で示し、文字は多形塩基を示す。表中のアライメントの右端に記載した設計 SEQ プローブおよびプライマーは、四角で囲った配列の領域と同一の配列であるか、またはそれと相補性である。アライメントの端に 2 つの名前がある場合は、最左端の名前が最も端の四角に相当し、最右端の名前が最も端の四角に相当する。プローブの次に、すべての DRB 対立遺伝子に示された領域にハイブリダイズされる。

A, B および C と命名された 3 組からなる表 1 には、DRB 特異性 DR1~DR18 に相当する 35 DRB1 対立遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

表 2 は DRB1 対立遺伝子の配列多形の主要領域は、アミノ酸配列アライメントを示す。DRB1 対立遺伝子の配列多形の主要領域は、アミノ酸位番号 9~18, 25~34, 67~74、および 88 に局在し、第二のエクソン配列の殆どは比較的の不变である。

表 3 には、DRB 対立遺伝子によってコードされる推定アミノ酸配列アライメントを示す。アミノ酸配列の分析から、数種の異なる対立遺伝子に見出される特定の多形配列をもつ複雑な、しかし限定されたパターンの多形が明らかにされた。しかしながら、一部の多形配列は各対立遺伝子に独特である。DR1, DR2, DR4, DR7, DR9, および DR10 対立遺伝子はそれぞれ、DRB1 遺伝子座最初の絶可変領域 (位番号 9~16) に独特的多形配列を有し、これは SEQ タイピングによる血清学的 DRB 特異性的決定に使用できる。これに対し、DR3, DR11, および DR6 対立遺伝子は、多形エピトープ "Y919" を共有し、この領域のプローブ单独では識別できないが、各対立遺伝子の他の位置における多形によって識別可能である。同様に、DR8 と DR12 も、この領域では識別できない。

五八

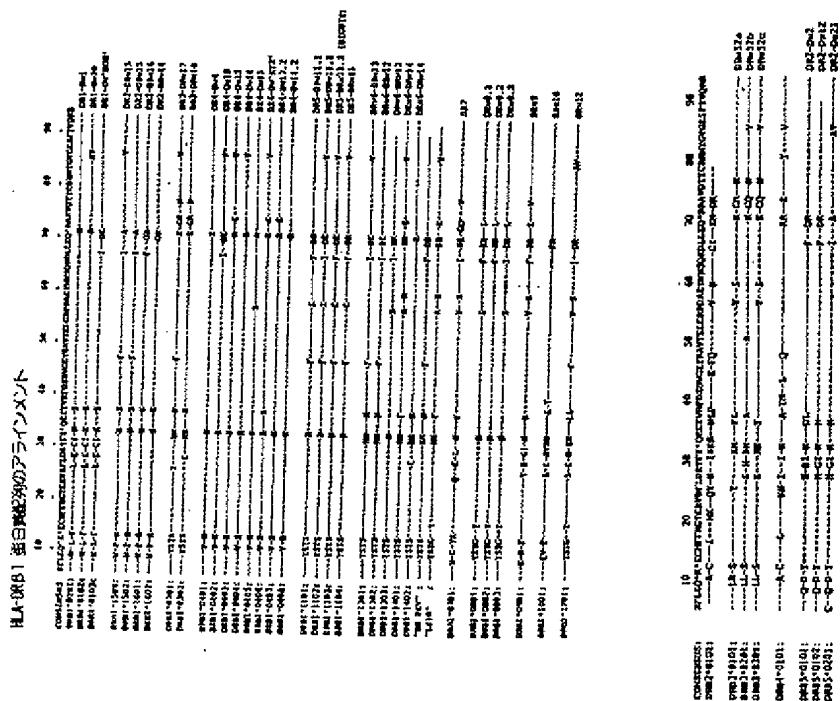
五1A

卷10

四

E E V I F R S O V G E T A V E L A P D A I X I O		C H 1 2		C H 1 3	
CH11	CH12	CH13	CH14	CH15	CH16
CH17	CH18	CH19	CH20	CH21	CH22
CH23	CH24	CH25	CH26	CH27	CH28
CH29	CH30	CH31	CH32	CH33	CH34
CH35	CH36	CH37	CH38	CH39	CH40
CH41	CH42	CH43	CH44	CH45	CH46
CH47	CH48	CH49	CH50	CH51	CH52
CH53	CH54	CH55	CH56	CH57	CH58
CH59	CH60	CH61	CH62	CH63	CH64
CH65	CH66	CH67	CH68	CH69	CH70
CH71	CH72	CH73	CH74	CH75	CH76
CH77	CH78	CH79	CH80	CH81	CH82
CH83	CH84	CH85	CH86	CH87	CH88
CH89	CH90	CH91	CH92	CH93	CH94
CH95	CH96	CH97	CH98	CH99	CH100
CH101	CH102	CH103	CH104	CH105	CH106
CH107	CH108	CH109	CH110	CH111	CH112
CH113	CH114	CH115	CH116	CH117	CH118
CH119	CH120	CH121	CH122	CH123	CH124
CH125	CH126	CH127	CH128	CH129	CH130
CH131	CH132	CH133	CH134	CH135	CH136
CH137	CH138	CH139	CH140	CH141	CH142
CH143	CH144	CH145	CH146	CH147	CH148
CH149	CH150	CH151	CH152	CH153	CH154
CH155	CH156	CH157	CH158	CH159	CH160
CH161	CH162	CH163	CH164	CH165	CH166
CH167	CH168	CH169	CH170	CH171	CH172
CH173	CH174	CH175	CH176	CH177	CH178
CH179	CH180	CH181	CH182	CH183	CH184
CH185	CH186	CH187	CH188	CH189	CH190
CH191	CH192	CH193	CH194	CH195	CH196
CH197	CH198	CH199	CH200	CH201	CH202
CH203	CH204	CH205	CH206	CH207	CH208
CH209	CH210	CH211	CH212	CH213	CH214
CH215	CH216	CH217	CH218	CH219	CH220
CH221	CH222	CH223	CH224	CH225	CH226
CH227	CH228	CH229	CH230	CH231	CH232
CH233	CH234	CH235	CH236	CH237	CH238
CH239	CH240	CH241	CH242	CH243	CH244
CH245	CH246	CH247	CH248	CH249	CH250
CH251	CH252	CH253	CH254	CH255	CH256
CH257	CH258	CH259	CH260	CH261	CH262
CH263	CH264	CH265	CH266	CH267	CH268
CH269	CH270	CH271	CH272	CH273	CH274
CH275	CH276	CH277	CH278	CH279	CH280
CH281	CH282	CH283	CH284	CH285	CH286
CH287	CH288	CH289	CH290	CH291	CH292
CH293	CH294	CH295	CH296	CH297	CH298
CH299	CH300	CH301	CH302	CH303	CH304
CH305	CH306	CH307	CH308	CH309	CH310
CH311	CH312	CH313	CH314	CH315	CH316
CH317	CH318	CH319	CH320	CH321	CH322
CH323	CH324	CH325	CH326	CH327	CH328
CH329	CH330	CH331	CH332	CH333	CH334
CH335	CH336	CH337	CH338	CH339	CH340
CH341	CH342	CH343	CH344	CH345	CH346
CH347	CH348	CH349	CH350	CH351	CH352
CH353	CH354	CH355	CH356	CH357	CH358
CH359	CH360	CH361	CH362	CH363	CH364
CH365	CH366	CH367	CH368	CH369	CH370
CH371	CH372	CH373	CH374	CH375	CH376
CH377	CH378	CH379	CH380	CH381	CH382
CH383	CH384	CH385	CH386	CH387	CH388
CH389	CH390	CH391	CH392	CH393	CH394
CH395	CH396	CH397	CH398	CH399	CH400

表3



HLA-DRB1*0102のアミノ酸

古典型的な血清学的方法で定義されるDRタイプ(DR3およびDR4を除いて)は、一般的 DRBプライマー-GH48 (SEQ ID NO:87) およびGH50 (SEQ ID NO:88) を増幅し、増幅生成物を表4に示す第一のパネルのプローブで分析することにより識別できる。表4に示す対立遺伝子特異性は、1989対立遺伝子セットに関するものである。本発明の目的においては、「一般的のプライマー」は、DRB遺伝子第二エクソン配列にハイブリダイスし、DRB遺伝子座の任意の対立遺伝子の増幅に使用することができるPCRプライマーである。増幅生成物がプライマー-GH50で発生された場合、GH60のハイブリダイゼーション部位のために、位置88(アミノ酸配列参照)の多形は試験できない。位置88の多形を分析できる生成物を発生して使用できる別のプライマーに DRB151 (SEQ ID NO:227)、*5'-CCGAAATTCCCGCTGCACTGTGAAAGCT-3'*がある。

表4: 第一のパネルの HLA DRBタイピング SSOプローブ

プローブ	SEQ ID NO:	エピトープ	HLA-DRB	対立遺伝子 (DRB1)	洗浄 (80°C)
CRX60	SEQ ID NO: 79	"V-L-R"	0101, 0102, 0103	0.4X, 42	
GH105	SEQ ID NO: 91	"Q-D-Y"	0103	0.1X, 42	
GH104	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	1501, 1502, 1601, 1602	0.2X, 42	
CRX59	SEQ ID NO: 87	"V-H"	0401-0408	0.2X, 42, 39*	
CRX68	SEQ ID NO: 81	"I-D-E"	0103, 0402, 1101, 1301, 1302	0.1X, 42	
GH122	SEQ ID NO: 93	"Z"	1101, 1102, 1103, 1104	0.2X, 42	
CRX23	SEQ ID NO: 66	"A-H"	1401, DR "LY10"	0.1X, 42	
CRX55	SEQ ID NO: 71	"P-DR"	1601, 1101, 1104, DR "PEV", 0601, 0802	0.2X, 42	
CRX49	SEQ ID NO: 74	"G-YK"	0701, 0702	1.0X, 42	
GH102	SEQ ID NO: 89	"T-SO"	0801, 0802, 0803, 1301, DR "LY10", 1402	0.1X, 42	
GH111	SEQ ID NO: 92	"K-D-S"	0901	0.4X, 42	
CRX34	SEQ ID NO: 70	"S-Y"	1001	0.4X, 42	
CRX04	SEQ ID NO: 60	"R"	0101, 0102, 0401, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 1402	0.1X, 42	
GH54	SEQ ID NO: 66	"Y-T-S"	0901, 0902, 1101-1104, 1301-1303, 1401, 1402, DR "PEV"	0.2X, 42	
CRX68	SEQ ID NO: 14	"P-DE"	1103	0.2X, 42	
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB "ALL"	全HLA-DRB 対立遺伝子	0.2X, 42	

表4に示すプローブをハイブリダイスし、ついで42°Cで15分間洗浄する。GH60のみは42°Cで20分間洗浄する。SSPE洗浄溶液はすべて、0.1% SDS を含有する。各プローブは 5'-末端で HRPに接合させる。

このPCR/SSO DRB タイピングシステムは、血清学的に定義されたハロタイプのサブタイピングに有用である。たとえば、細胞系 "KOSF" は血清学的に判定した場合、DRw6にホモ接合であるが、PCR/SSO DRB タイピングから、"KOSF" には2つの異なるDRB対立遺伝子、DRB1*1302 およびDRB1*1401 があることがわかつている。

DR2 または DRw6 であるサンプルは、DRB1特異的プライマー-GH48およびCRX37で増幅し、増幅生成物を第二パネルのプローブからのプローブ GH125と CRX60で分析して、識別できる。

表5: 第二のパネルの HLA DRBタイピング SSOプローブ

プローブ	SEQ ID NO:	エピトープ	HLA-DRB	対立遺伝子 (DRB1)	
				洗浄 (SSPE, °C)	
CRX55	SEQ ID NO: 94	"Y"	0301	0.2X, 40	
CRX50	SEQ ID NO: 15	"K-DR"	0301, 0302	0.2X, 40	
CRX34	SEQ ID NO: 70	"K"	0401	0.5X, 35	
CRX59	SEQ ID NO: 64	"R-E"	0403, 0406, 0407	0.4X, 35	
CRX61	SEQ ID NO: 81	"D-K"	1301	0.2X, 40	
CRX33	SEQ ID NO: 73	"I-DR"	0603, 1301	0.2X, 40	
CRX61	SEQ ID NO: 30	"S"	0405, 1301, 0601, 0603	0.1X, 42	
CRX54	SEQ ID NO: 45	"V-Z"	0701, 0901, 1201	0.2X, 42	
CRX56	SEQ ID NO: 50	"Q"	0101, 0103, 0302, 0401, 0403, 0407, 0408, 1101, 1302, 1301, 0701, 1301, 1601, 1401, DR "PEV", 0801, 0702, 0803, 1502, 1601, 1602	0.2X, 42	
CRX57	SEQ ID NO: 18	"V"	0301, 0401, 0403, 0404, 0405, 1102, 1103, 1104, 1301, DR "LY10", 1401, 1301	0.1X, 42	
CRX13	SEQ ID NO: 63	DRB "ALL"	全HLA-DRB 対立遺伝子	0.2X, 42	

表5に示すプローブについては、SSPE洗浄溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。さらに、*の記号を付したプローブは、プライマー-GH48/CRX37でのDRB1特異的増幅を要求する。CRX164は42°Cではなく50°Cでハイブリダイズさせる。各プローブは 5'-末端で HRPに接合させる。プローブ CRX56およびCRX57はそれぞれ、エピトープ "G" およびエピトープ "V" 対立遺伝子とは完全な塩基対を作らない。これ

特表平6-505625 (9)

ら、DRB1配列を再現性よく増幅することができる。プライマー-CCR37はDR3, DR4, およびDRw6ハロタイプからのイントロンヌクレオチド配列から設計された (Horn 等: Sequence analysis of HLA Class II genes from insulin-dependent diabetic individuals. *Hum Immunol.* 1:249, 1988 参照)。

本説明は、DBT特異的プライマー对 GH45/CRX37 に加えて、多数の対立遺伝子および群特異的プライマーを提供する。これらのプライマーを以下に示す。AB60 の配列については、Toddら(Nature 328:609, 1987)参照。

AB54	SEQ ID NO: 56	5'-GGGATCTTCTUGACAGGTTAAACA-3'
AB60	SEQ ID NO: 57	5'-CCGAAATTCTCGCTGCACTGTGAACTCTG-3'
AB82	SEQ ID NO: 58	5'-GGGATCTTCTUGACTCTCACOTC-3'
AB83	SEQ ID NO: 59	5'-GGGATCTTCTUGACAGGTTAAACA-3'

たとえば、DR4 特異的増幅は PCR プライマー-対 A884/A890 を選用できる (PCR フィル: 36 サイクル; 94°C でランプ、94°C で 30 秒変性、30 秒アニーリング、66°C で延伸)。DR3, DR5, および DR6 群特異的増幅は PCR プライマー-対 A882/A890 で

特異的対立遺伝子群は、本研究結果に記載のエピトープ特異的アブリーバーによる生物学的活性を示す。

具体的な実験結果によれば、DR1#1601 は、「F-DR」エビトープ特異的ブロープを用い、AB83/AB80 プライマー対で DR2 特異的増幅後に検出できる。たとえば、DRB1#1601 は、「F-DR」エビトープ特異的ブロープを用い、AB83/AB80 プライマー対で DR2 特異的増幅後に検出できる。

DR2 ハロタイプの対立遺伝子の検出は困難であるが、それは本発明の群特異的プライマー-ヒブティング方法により克服される。DR2 ハロタイプからの DR8 対立遺伝子の一般的なプライマー増幅では、DR81 および DR850 の両対立遺伝子座が増幅される。血清 DRw15 および DRw16サブタイプの決定には、「F」(位置 47) エピトープ特異的 DNA プローブを使用せよたが、「F」(X0301, 一部の DRw13 対立遺伝子、ならびにすべての DRw11 および DRw12 対立遺伝子にも存在し、他の方法によればさらに完全な識別が可能になる。すなわち、エピトープ「I-A^{*}」をコードする配列にハイブリダイズするように設計された群特異的プライマーハロB14501 および DR81*1502 対立遺伝子を増幅し、増幅生成物が「NP」エピトープ特異的 DNA プローブとハイブリダイズする。プライマー DR8150 (SEQ ID NO:226) (5'-TGTCACCCCGGCGCCGCGCCT-3') は、このような対立遺伝子特異的増幅 (GH48C) の実施のために

らのプローブは、対立遺伝子より G残基が 1 個少ないからである。CRX56 および CRX57 が全く G 残基をきめように改良したプローブは本発明の範囲内に包含される。

本発明の目的では、「DRB1特異的」プライマーは、DRB1連鎖子の第二エクソンに接続するイントロン配列にハイブリダイズし、他のDRB連鎖子にハイブリダイズしない少なくとも1つのプライマーからなるプライマー対である。表6には、DRBハロタイプのDRB1およびDRB3のイントロンのヌクレオチド配列の、最後の10のコドンから3'下流イントロンの開始前までを示す。CXR37 (SEQ ID NO:73)に下線を付す。実線の矢印はプライマーの延長方向を指示する。塗印はDRB1およびDRB3イントロン配列の間の配列の相違を示す。3'下流イントロンのセグメントは、配列場所部に、SEQ ID NO:314 (DRB1) および SEQ ID NO:316 (DRB3)として掲げる。イントロンの上流配列は対立連鎖子配列内にある。

卷八

DR3, DR4, およびDR6ハロタイプは、DR2, DR7, およびDR8 ハロタイプと、進化論的に異なることものと思われる。これらの対立遺伝子には、プライマーが延長を誘導するにはミスマッチが多くさうような、イントロン配列に差があると考えられる。DR1対立遺伝子は遺伝子構造以前に進化で分化してしまったために、すべてのDRハロタイプからのDR1遺伝子第二エクソンを増幅させるための別ルート的プライマー配列を見出しが困難なのかもしれない。

HLA DRB1対立遺伝子は、一般的およびDRB1特異的プライマーで増幅し、必要に応じて西バカル（表4および5）のプローブで分析することにより、より高い特異性で識別できる。表4および5の特異的プローブで識別できなない1988対立遺伝子セットの対立遺伝子は、4つのDR2サブタイプ、DRB1*1501, *1502, *1601、および*1602ならびにDR4サブタイプ、DRB1*0403、およびDRB1*0408である。

OR81特異的 PCRプライマーは、OR2, OR7、および OR9ハロタイプを除くすべてか

設計されたプライマーである。OR864#201 および OR864#202 対立遺伝子も既（エビトーフ 特異的 “1-” プライマーで同時に増幅されるが、これらの対立遺伝子は OR811#1601 および OR811#1602 対立遺伝子としか存在しないので、プローブハイブリダイゼーションの結果はエビトーフ “0P” 感性および “NP” 感性である。さらに、本明細書に示した OR1 特異的プライマーは OR2 対立遺伝子を増幅しないので、上述の OR2 特異的増幅は、同じ反応管中で、OR81 特異的増幅と同時に実現できることに注目すべきである。他の対立遺伝子および群特異的プライマーやおよび増幅方法は実施例に記述する。

HLA DRB 遺伝子座における著しい対立遺伝子の多様性は、他のクラスⅡ系遺伝子の場合と同様に、主として第二エクソンに局在する。一般的には、第二エクソン配列多形のパターンは、特定の DRB 遺伝子座において該群に存在する場合には、多様な異なる対立遺伝子に認められる特異的多形セグメントをもつ寄せ集めである。原理的には、このような異なる対立遺伝子間で共通のエピトープには、共通の祖先、遺伝子変異、または収束進化の反映を示すことができる。しかしながら、オリゴヌクレオチドの選択目的の目的では、この多形の巣を無めるパターンは、単一のオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによつては多くの対立遺伝子は肯定することができず、パネルのプローブによる独特なハイブリダイゼーションパターンによって同定できることを意味する。

"SSO"と呼ばれる本発明の配列特異的オリゴヌクレオチドプローブは、適当なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下に本発明の方法に使用されると、極めて特異的で、単一のヌクレオチド多形を識別できる。RFLP法で用いられるプローブとは異なり、本発明の SSOは、対立遺伝子が異なるかどうかのみでなく、対立遺伝子がどこでどう異なるかを決定するためにも使用できる。

好みしい実施標本においては、プローブは、表1 および2で四角に西んだ各対立遺伝子のDNA領域と同じ配列またはそれに相補性の配列からなる。たとえば、プローブCRX60はアミノ酸“Y-F-L”をコードするDNAに特異的で、OR1 対立遺伝子に特にハイブリダイズする。プローブCRX48はアミノ酸をコードする“G-T-Y”に特異的で、OR7 対立遺伝子に特にハイブリダイズする。他の例は表を参考すれば明白であろう。

DR3, DRw11, およびDRw6を他のDR血清型から識別するためには、単一のプローブ

(すなわちGH5B)を使用すればよいが、DR3, DR11, およびDR6の間での識別には付加的なプローブが必要である。DR110をDR3 およびDR6から識別するためには、DR11 上の "YTS3" および "E" エピトープ (コドン10~13および58) をコードする DNA にハイブリダイズするGH65+CH122 プローブの組み合わせが使用できる。同様に DR6 (DR811+1301 および DR811+1302 をだしエピトープ "-OK" を有するが、またはDR6であるDR811+1303 は含まれない) 在DR11 および DR3から識別するためには、"YTS3" および "I-0E" (コドン67~71) エピトープに相当するプローブの組み合わせGH64+CH122が使用できる。

大部分の血清IgM型を決定するためには、表4記載のSSOプローブの組合せを用いる。

三

血清DR型の決定に使用されるSSOプローブの組み合わせ

DR2 - 7296	GH102 + CRX35
DR1 Dw1	CRX60 + CRX04
DR1 Dw "BON"	CRX60 + CRX06
DR2	GH105
DR4 Dw4	GH59 + CRX33
DR4 Dw10	GH59 + CRX06
DR4 Dw13, 14, 15	GH59 + CRX04
DR3, w11, w6	GH36
DRw11.1	GH36 + GH122 + CRX35
DRw11.2	GH36 + GH122 + CRX06
DRw12, DRw4.3	GH102 + CRX63
DRw13 (1301, 1302)	GH56 + CRX06
DRw14 Dw1.6	GH56 + CRX04
DRw14 Dw9	GH56 + CRX23
DR7	CRX49
DRw8.1, w 8.2	GH102 + CRX35
DR9	GH111
DRw10	CRX34
DRw12, all DRw8	GH102

DR血清型（表4）をさらに細分類するためには、以下の表8に示すように、表8に示すプローブの使用が推奨されあ。

特表平6-505625 (10)

ある。Sekiら:Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6230, 1991 および1989年5月4日出願の係属中の出願番号第347,496号参照。これは参考として本明細書に導入する。この操作においては、SSOプローブはフィルターに適用され固定されるので(フィルターに適用されたされる複数DNAよりも)、「逆相ドットプロット」の語が使用される。

逆相ドットプロット操作によれば、単一のサンプルを、一道の固定化プローブを含有する膜と1回ハイブリダイズさせることで分析が可能となる。サンプル数が使用プローブを越える場合(たとえば、患者対コントロールまたは集団遺伝学研究)では慣用のドットプロットフォーマットが有用である。逆相ドットプロットフォーマットは、確実的、診断的、および法科学的分析に場合に適応がある。逆相ドットプロットフォーマットは例題に記載する。

以下の実施例は本発明の好ましい実施様式を示すものである。この例は、本発明が、好ましい実施様式においては、多様な起源からの様々なサンプルについての単純、迅速かつ正確な DRB タイピングを可能にする HLA DRB タイピングのための非同位元 PCR/SSO システムを提供することを示している。

例1
増幅および検出方法

プローブの第一のペア(表4)でのサンプルのタイピングには、0.6ugのヒトゲノムDNAを、Sekiら:Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science 239:487, 1988; Scharffら:Hum. Immunol. 22:81, 1988; およびScharffら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8216, 1989に記載された反応成分を用いて増幅した。これらの文献は参考として本明細書に導入する。

HLA DRB 一般的 PCR プライマーは GH46 および GH50 である。これらのプライマーの配列を以下に示す。

GH46 SEQ ID NO: 67 5'-CCCGATTCCTTGTATCCCAACACACG
GH50 SEQ ID NO: 68 5'-CTCCCCAACCCCTAGTTGTCTCACA

プライマーは反応混合物中に 500nM 存在させた。これらのプライマーは、272 倍率(2¹⁰) フラグメントを生成し、PCR 産物をクローニングするための BamH I および Pst I 制限部位の配列を含有する。増幅DNAをBamH I および Pst I で切

“HRP-SSO”と呼ばれる本発明の西洋ワサビペルオキシダーゼ接合SSOには、使用が簡単で検出可能なシグナルを急速に(通常1~10分)生成する発色性または化学発光性基質を使用する検出方法が許容される。HRP-SSO は4°Cで保存すれば、活性の明らかな低下を伴うことなく2年以上にわたって安定である。PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, Gelfand, Sninsky & White 編, Academic Press, Inc., San Diego, 1989刊) 中の Levenson & Chang による “Non-isotopically labeled probes and primers” と題する論文を参照。放射標識プローブも使用できるが、本発明によって考えられる重要な利点は優れた感度であって、その必要はない。

検出のためのドットプロットフォーマットは、多数のサンプルの迅速なタイピングを可能にし、HLA DRB の対立遺伝子増幅の決定に有用である。PCR/SSO DRB タイピング用に最近開発された方法に固有化逆相ドットプロットフォーマットが

化すると内部Pst I 部位により 248bp 産物が生成する。

すべてのハロタイプ(DR2, DR7, および DR6 を除く)からのDRB1対立遺伝子は、PCR プライマー GH46 および CRX37 によって特異的に増幅された。CRX37 プライマーの配列を以下に示す。

CRX37 SEQ ID NO: 73 5'-GAAATTCCCCGGGGGGGG

GH46/CRX37 プライマー対での増幅は、287bp フラグメントを產生する。プライマー CRX37 は、5'末端に EcoRI 制限エンドヌクレアーゼ認識配列を挿入してクローニングを容易にし、プライマー対 GH46/GH50 と異なり、このプライマーでの増幅および BamH I / EcoR I 消化は完全長 PCR 産物の準備および分析を可能にする。

このような準備および分析は多くの場合、PCR 産物のスクレオチド配列の決定を含む。HLA DRB 対立遺伝子の配列決定には、1 μg の構製ヒトゲノムDNAをプライマー対 GH46/GH50 および GH46/CRX37 を用いて増幅した。増幅されたDNAを、Scharffら:Hum. Immunol. 22:81, 1988 および Scharffら:Hum. Immunol. 23:1078, 1988(これらの記載は参考として本明細書に導入する)に記載の方法によって、M13mp10 にクローン化した。挿入体を次に、Sangerら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:6463, 1977 に記載のジデオキシチエーン-ターミネーション操作(1988年9月23日出願の米国特許出願第 249,387 号を参照。この記載は参考として本明細書に導入する)によって配列決定した。

上表1 および2 に示した記載は、ゲノムクローニングにより(Hornら: Hum. Immunol. 21:249, 1988 参照。この記載は参考として本明細書に導入する)、PCR 増幅により [Erlichら:Immunobiology of HLA (du Pont 編, Springer-Verlag, New York) 1989 年刊、および Scharffら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8215, 1989 参照。この記載は参考として本明細書に導入する]、または文献(第 10 名委員会: Immunogenetics 31:131, 1990; および Gregersenら: First domain diversity of DR and DQ subregion alleles in Immunobiology of HLA (du Pont 編, Springer-Verlag, New York) 1989 年刊参照)から得られたものである。

サンプルは、Taq ポリメラーゼ(PEI, Norwalk, CT) 1.25 單位(2.5 單位でなく)を反応容積 100 μl あたり加えたほかは上述の反応条件を用い、32サイクル(どこに指示のない限り)で増幅した。膀胱癌患者についての cDNA を、HLA-DRB 遺伝

子座で、報告されているように(Kawasaki): "Amplification of RNA" In PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis 編, Academic Press, San Diego) 1989 刊参照)増幅した。すべてのサンプルを高級試油(Sigma, St. Louis, MO) 100 μl で覆し、熱封を防止した。増幅後、凍結被覆液を 100 μl のクロロホルムで抽出した。

各サイクルの熱プロファイルは以下の速度での表示時間のインキュベーションとした。すなわち、84°Cで45秒(DNA 鎮の変性)、55°Cで45秒(プライマーのアニーリング)、および 72°Cで45秒(剤激酵素の延長)である。最終サイクルのうちに、PECI サーマルサイクラー(Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT) は、最終の延長が完全に行われることを確実にするため、サンプルを 72°Cで10分間インキュベートするようにプログラムした。サンプルの交差汚染を防ぐための注意が必要である。とくに、一つのPCR の産物を非増幅サンプルと交換せることは防止されなければならない。1989年7月24日出願の米国特許出願第 557,517 号およびその出願の1990年11月2日付 CIP 出願(いずれも、参考として本明細書に導入する)には、非増幅サンプルに「キャリオーバー」した PCR 産物の増幅を防止する好ましい方法が記載されている。

増幅後、増幅DNAの小部分を変性し、一道のナイロンフィルターへのクロスリンクによって固定した。各フィルターをついで原株プローブの一つにハイブリダイズした。各 SSO プローブは西洋ワサビペルオキシダーゼ(IRF) に共有結合で接着させ、発色性または化学発光性基質の存在下における非同位元検出手段を提供する。又クロレオチド配列コードされたアミノ酸(またはエピトープの可能性)、および固定されたDR型、ならびに各プローブの洗浄条件を表4 および5 に掲げる。

すなわち、各増幅 DNA サンプル 5 μl を、0.4M NaOH および 25mM EDTA からなる混合物 100 μl と混合し、得られた混合物を、ドットプロットマニフォード(BioRad, Richmond, CA) を用いて BioDyne B ナイロンフィルター(Pall Corp., Glen Cove, NY) に適用した。またドットプロットマニフォルド中にあるフィルターを、10mM Tris-HCl および 0.1mM EDTA からなる混合物 pH 8.0 で洗浄し、Whatman 3MM 清紙で乾燥させた。Stratalinker™(Stratagene, La Jolla, CA) UV 光線ボックスを用い、出力 65mJ/cm² での紫外線照射により、DNA をナイロンフィルター上に固定化した。

特表平6-505625 (11)

他の記載がない限り、フィルターはすべて、 $2 \times$ SSPE (食塩・リン酸ナトリウム EDTA、 $5 \times$ デンハルト溶液および 0.5% SDS 中、ハイブリダイゼーション溶液 1 mlあたり 2 nmol の HRP-SSO プローブを用いて、42°Cで 15 分間ハイブリダイズした。西洋ワビペルオキシダーゼ接合オリゴヌクレオチドは、Levenson & Cheng: In PCR Protocol: A Guide to Methods and Application (Innula 著、Academic Press, Inc., San Diego) よりび Sekiら: J. Med. 319:537, 1988 の記載に従つて製造された。各プローブのフィルターは 25 ml の SSPE 溶液中、表 4 および 5 に示した温度で 15 分間 (他の記載がない限り) 洗浄した。

洗浄後、発色性の染料試薬で展開すべきフィルターは、PBS 中温まで 30 分間洗浄し、ついで 0.1 mg の 3', 5', 6'-テトラメチルペナンゲシン (TMB) (Fluka) を 1 ml あたり、および 0.015% の過酸化水素を含むする 100 mM クエン酸ナトリウム中に取り、種やがに搅拌しながら室温で 15 分間インキュベートした。展開したフィルターを PBS 中ですすぎ、直ちに撮影した。化学发光検出系 (ECL; Amersham, Arlington Height, IL) で展開したフィルターは PBS 中で 5 分間すすぎ、種やがに搅拌しながら PBS 液中に 1 分間置いた。ついで、フィルターは室温で 1~5 分間 X 線に露出した。

例2 DRB1特異的増幅

各種 DRB1対立遺伝子を識別する DRB1対立遺伝子の対立遺伝子の数種の多形配列は、他の DRB 遺伝子座の対立遺伝子上にも存在する (表 3 参照)。DR3 DRB1対立遺伝子上のエピトープ "K-DR" (コード番号 71~74) をコードするヌクレオチド配列がその例であり、この領域に対するプローブ (CRX50) は DRM185 および DRW6 対立遺伝子から DR3 を識別できる。しかしながら、このエピトープは、DRB3 対立遺伝子 DRw52a (DRB3*0101) によってもコードされ、一部の DRW6 ハロタイプおよび一部の DR3 ハロタイプ上にも同様に存在する。PCR プライマー DRH46/DRH50 はすべての DRB 遺伝子座を増幅するので、DRB1 対立遺伝子座において DRW52a であった DRW6 サンプルを、このプローブを用いて DR3 サンプルから識別することは不可能である。

本発明は、DRB1 対立遺伝子のため特異的に増幅する PCR プライマーを提供することによって、この問題を解決する。これらのプライマーの一つは、第二のエクソンから下流のイントロン内領域にハイブリダイズする。イントロンは、DRB1

と DRB3 対立遺伝子座を識別する配列を含むする。プライマー (CRX37) は DRB1 イントロン配列に特異的にハイブリダイズし、このプライマーを GH46 と組み合わせると大部分のハロタイプについて DRB1 対立遺伝子座を识别する。

DRB1 対立遺伝子座がこれらの DRB1 特異的プライマー複核で増幅される唯一の遺伝子座であるかどうかを確認するために、DR2, DR3, および DR4 HTC (ホモ接合タイプ) DNA を、これらのプライマー 3' およびすべての DRB 遺伝子座のための SSO プローブで増幅し、分析した。DRB1 対立遺伝子座に加えて、DR2 ハロタイプは DRB2 および DRB3 対立遺伝子座を有し、DR3 ハロタイプは DRB3 対立遺伝子座を有し、DR4 ハロタイプは DRB4 対立遺伝子座を有する。結果は図 1 に示す。

これらの結果を得るには、約 200 ng の HTC DNA を一般的 DRB プライマーである GH46/GH50 または DRB1 特異的プライマー GH46/CRX37 によって増幅し、例 1 の記載のようにフィルターに適用した。増幅触媒系 (QIA (サンプル 1~4)) を含有する各フィルターは図 1 に示すプローブとハイブリダイズさせた。各プローブがハイブリダイズする遺伝子座をカッコ内に示す。CRX36 は DR4, DR7, および DR8 の DRB4 対立遺伝子座にハイブリダイズする。CRX22 は DRB3 対立遺伝子座 DRw52b にハイブリダイズする。

SSO の配列:

CRX36	SEQ ID NO: 72	5'-CCCGCTCTCCGCTCCA
CRX22	SEQ ID NO: 65	5'-GAGCTGCTTAAGCT

は、Schart ら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6215, 1989 によって記載されている。この記載は参考文献に本明細書に準ずる。

プローブ CRX1 (SEQ ID NO: 88, 5'-CTCCCGTTTATGGATGTAT) は DRB2 対立遺伝子座に特異的にハイブリダイズする。このプローブは例 1 に記載したようにハイブリダイズさせ、 $1 \times$ SSPE, 0.1% SDS 中、42°Cで 15 分間洗浄した。増幅されたサンプルは、(1) HTC DNA (陽性对照); (2) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; および (4) DR4 HTC "BSM" である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化洗剤ミネッセンスで洗出された。

図 1 は、3 つの HTC すべてについてのすべての DRB 対立遺伝子座は一般的 DRB プライマーで増幅するが、DRB1 特異的プライマーは DR3 および DR4 HTC からの DRB1 対立遺伝子座を増幅するのみであることを示している。興味あることに、DR2 HTC につ

いては、DRB2 対立遺伝子座は、弱いとはいえ、DRB1 特異的プライマーで増幅される。DRB1 特異的プライマーは、図 1 および 2 に示すように、DR2, DR7, および DR9 を除き、試験されたすべての DRB ハロタイプからの DRB1 配列を効率的に増幅する。図 2 に示す結果を得るには、HTC からのゲノム DNA 約 0.5 μg を、DRB1 特異的プライマー GH46/CRX37 で、HLA DRB について増幅した。増幅反応およびフィルターは、例 1 に記載したのと同じである。各フィルターは示したプローブの一つと、適当なハイブリダイゼーション条件にてハイブリダイズし、蒸気滅菌条件下に洗浄した (表 4, 5 および 7 参照)。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、フィルターは発色性試薬 TMB を展開した。サンプルは、(1) DR1 HTC "KAS9003"; (2) DR1 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DRw11) HTC "SPODIO"; (6) DRW6 HTC "OMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DRW6 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DRW10 HTC "SHY" である。

図 2 の結果は、DR7 プローブ CRX46 ("G-Y") が、この実験では弱く増幅された DR7 HTC にはハイブリダイズしないことを示している。これらの結果から、完全な DRB1 タイピングには一般的および DRB1 特異的プライマーを使用できることが明らかである。

例3 血清型 1~10 のタイピング

HTC からのゲノム DNA 約 0.5 μg を、HLA DRB について増幅した。3 番および 6 番を除くすべてのサンプルは一般的プライマー GH46/GH50 で増幅した。3 番および 6 番のサンプルは、DRB1 特異的プライマー GH46/CRX37 で増幅した。増幅反応およびフィルターは、例 1 に記載したのと同じにして準備した。各フィルターは示したプローブの一つと、適当なハイブリダイゼーションおよび蒸気滅菌条件下にハイブリダイズさせた (表 4, 5 および 7 参照)。プローピングおよび洗浄後に、フィルターは発色性試薬 TMB を展開した。サンプルは、

(1) DR1 HTC "KAS9003"; (2) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DRw11) HTC "SPODIO"; (6) DRW6 HTC "OMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DRW6 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DRW10 HTC "SHY" である。

図 3 は、古典的、血清学的に定義された DR 型 1~10 についての、HTC のパネル

上での DR タイピングの結果を示す。各古典的 DR 型の検出に唯一のプローブを使用することができるが、2 つの異なる PCR プライマーが必要であった。DR3 および DRW6 を除くすべてのサンプルで、一般的 PCR プライマー GH46/GH50 が使用できる。この系の DR3 および DRW6 サンプルの DR4 の増幅には、DRB1 特異的プライマー対 GH46/CRX37 を使用した。DR3 HTC "QBL" (DRw11) 上の "Y" エピトープ (GH126; コード番号 26) を検出するためには使用されたプローブは、DRW6 サンプルの DR3 対立遺伝子 (DRw52a) 上にも存在するからである。標準 DRB プライマーを使用されていないならば、"Y" プローブは DRW6 サンプルにも同様にハイブリダイズしたと考えられる。

例4 一般的 DRB1 タイピング結果

特定のサンプルのタイピングに際しては、一般的のプライマーを最初の増幅に使い、ついで増幅 DNA を最初のパネルのプローブによってプローピングしなければならない (表 4 および 7)。このパネルのプローブは大部分の血清型を問はずるが、GH50 ("YTS") は DR6 から DR3 を明らかに識別しない。

GH50 で陽性を示したサンプル、または特定の DR 型の組合せ (たとえば、DR4 の α 型または DRW6 の β 型) を示すサンプルには、第二のパネルのプローブ (表 5) を使用しなければならない。上述のように、第二のパネルの一部のプローブは PCR プライマーの DRB1 特異的対による増幅を要求する。第一および第二のパネルからのプローピングを組み合わせることにより、DRB1 対立遺伝子セットにおける 34 の DRB1 対立遺伝子中、31 の識別ができる。これらの対立遺伝子の同定に用いられる SSO プローブの組み合わせを表 5 に示す。これらのプライマーおよびプローブによつては DR2 サブタイプ (DRB1*1601, *1602, *1601, および *1602) は識別されず、これらのプローブによつては DRB1*1603 と DRB1*1604 対立遺伝子は識別されない。

本発明の一つの DR2 プローブは、DRB6 対立遺伝子座の第一の越可変領域 (G-Y-Y') にハイブリダイズする配列からなる。DRB6 対立遺伝子座はすべての既知 DR2 ハロタイプ上に存在し、それらのハロタイプ上にしか存在しないので、このようなプローブは、一般的 DRB プライマーで増幅した DR2 の型の判定に信頼をもつて使用できる。プローブ GH104 ("Y-P-R") は DR2 DRB1 対立遺伝子座の第一の越可変領域にハイブリダイズし、一般的 DRB プライマーで増幅すると DR2 DNA に特異的にハイブリダイズす

特表平6-505625 (12)

る(図1)が、DRB1特異的プライマーではハイブリダイズしない。これらの2つのプローブは一般的プライマーでの増幅においては、DRBの同一のインジケーターである。

例5

DR4のサブタイプ

DR4特異性のサブタイプは血清学的には実施できない。サブタイプは二次元蛋白質ゲル電気泳動および免疫性ダイピングによって明らかにされたが、両方法とも実際で専門家がかかる。DR4、DR10、DR13、およびDR14は互いに、遠伝子の第三の超可変領域の位置70~74で異なっている。DR15はまた、位置57にセリン("S")を有するが、位置74のグルタミン酸("E")で異なる。

結果として、SSOプローブ、CRX04 ("R-E")はDR13、DR14、およびDR16対立遺伝子にハイブリダイズする。これらの対立遺伝子を互いに識別するには、さらにプローブが必要である。SSOプローブ、CRX15 ("R-E")はDR15をDR14およびDR15から特異的に識別し、CRX15 ("S")はDR14からDR15を特異的に識別する。様々なDRB1対立遺伝子(たとえばDR14.1またはDR14.2からのDRB1*4044またはDRB1*4048)を識別する位置380 ("G"対"E")多形はCRX56プローブ ("G")およびCRX57プローブ ("E")を用いて検出される(表7参照)。

DRタイプ1~10のHCTCおよび5つのDR4サブタイプは、DRB1特異的プライマー-CH46/CRX37で増幅し、6つの同一のナイロンフィルターに適用し、DR型に特異的なHRP-S90とハイブリダイズさせた。結果は図4に示す。

図4に示した結果を得るために、約500 ngのHCTCゲノムDNAを上述のDRB1特異的プライマー-CH46/CRX37によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図4に示すプローブとハイブリダイズさせた。サンプルは、列Aでは、

- (1) No DNA control; (2) DR1 HCTC "KA59003"; (3) DR2 HCTC "SCHU"; (4) DR3 HCTC "QBL"; (5) DR4 HCTC "BSM"; (6) DR4.1 HCTC "YAR"; (7) DR4 DR13 HCTC "RAA"; (8) DR4 DR14 HCTC "BM92"; (9) DR4 DR15 HCTC "LKT3"; (10) DR5 HCTC "SP0010"; および(11) DR4 DR16 HCTC "OMW"; 列B: (1) No DNA control; (2) DR4 HCTC "MOU"; (3) DRw8 HCTC "SPACH"; (4) DR9 HCTC "DKB"; および(5) DRw10 HCTC "SHV"である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化ルミニスцен

スで検出された。パネルAは、DR2、DR7、およびDRw8 HCTCを除くすべてがCRX12にハイブリダイズすることを示している。

パネルBは、DRX63 カテW4 HCTC BSM に特異的にハイブリダイズすることを示している。DR4 DR4 のダイピングのため他のプローブには、DRB1*03 (SEQ ID NO: 230)があり、例6に記載のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。ズする。低い溶解条件(2 × SSPE, 5 × デンハート, 0.5% SDS, 42°C 15分ハイブリダイゼーションおよび2 × SSPE, 0.1% SDS, 42°C 35分洗浄)ではるがに強いシグナルを与えるDR4 DR4 のダイピングのためのさらに他のプローブは、以下に示すプローブCRX64である。

CRX64 SEQ ID NO: 83 5'-ERP-CAGGAAIAACGCGGCC-3'

HAPは西洋ワビペルオキシダーゼである。Iはイノシンで、これはプローブを不安定化する。

パネルCはDR10 HCTC "YAR"のSSO CRX06 ("I-OE")による検出を示す。このプローブはHCTC "OMW"にもハイブリダイズし、これはDR13でありこの多形を共有する。

パネルDは、CRX15の特異的ハイブリダイゼーションを示し、これはDR13サンプルJHAを、DR14サンプルBL2およびDR15サンプルLKT9から識別する。

パネルEは、CRX04の、それぞれDR13, DR14、およびDR16であるJHA BN92、およびLKT3へのハイブリダイゼーションを示す。CRX04はDRB1*0101であるDR1 HCTC KA59003にもハイブリダイズし、これらの3つのDR型とこの多形 ("R")を共有する。DR4 DR14型は、サンプルがCRX15 ("R-E")またはCRX01 ("S")/パネルEのいずれにもハイブリダイズせず、CRX04 ("E")とハイブリダイズするプローブハイブリダイゼーションパターンから、推測される。パネルFは CRX01のDR1 HCTC "LKT3"へのハイブリダイゼーションを示す。

図4は、一般的に、本発明が、第一のパネルのプローブへのハイブリダイゼーションのパターンにより、これらのプローブで識別される多形領域を共有するサンプルを識別できることを示している。たとえば、"R"エピトープ陽性のDR4 DR型はGH68 ("V-H")陽性およびCRX80 ("V-L-F")陽性により DR1から識別され、DR4 DR10は、GH68陽性およびGH66 ("YSTS")陽性により DR13から識別される。

表8は、このシステムが識別できない2つのDR4サブタイプDRB1*4043およびDRB1*4048対立遺伝子であることを示している。これらの2つの対立遺伝子は

す(例7参照)。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化ルミニスценスで検出された。各サンプルにハイブリダイズするプローブのパターンを決定することにより(表7参照)、図6に示すように、サンプルは特異的な対立遺伝子に分類できる。図6には、プローブにハイブリダイズしたサンプルに+の記号を付してある。図6は待ったプローブにハイブリダイズしなかつたサンプルを示している。"KOS"および"BAR"を除いて、すべてのサンプルがホモ接合型細胞であった。

DR1 DR5 DRw6、およびDRw8サンプルのハイブリダイゼーションデータおよびドット型は図6に示す。サンプル "KOS"は血清学的にDRw6ハロタイプのホモ接合体と分類された(このサンプルはDR6 およびDR1と表示されていた)。しかしながら、それはDRB1*1102 (CRX06+CRX56)およびDRB1*1401 (CRX23+CRX57)と分類された。

サンプル "BAR"は血清学およびHLAで DR4 DR10 およびDRw6と分類される。したがって、"BAR"はプローブ CRX36およびCRX56 ("F-DR"および"E")にハイブリダイズし、これにより新たに発見された"DR PEV" DRw6対立遺伝子として分類され、またプローブ CRX06およびCRX57 ("I-OE"および"E")的にハイブリダイズして、DR4 DR10対立遺伝子 (DRB1*4042) の存在を反映している。

例7

細胞系のDRタイプ

確立された細胞系の多くはクラスII分子を発現しないので、それらのDR型を血清学的に判定することは不可能である。ブラインドパネルとしてコードされた6つのクラスII陰性細胞系を一般的のプライマー-CH46/CH50で増幅し、第一のパネルのプローブ(表4)で検査し、サンプルの一般的血清DR型を確立した(図7)。

これらのおよび他の細胞系のDR型判定のために、100 ngの細胞DNAを一般的HLA DRBプライマー-CH46/CH50により、30サイクルを行つて増幅した。増幅された細胞系DNA(サンプルA~F)を含有する各フィルターを、一般的HLA DRBプライマーで増幅したHCTC DNAを含有する対照フィルター(サンプル1~11)と同時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて例1に記載のようにして調製した。結果は図7に示す。各フィルター対は、示したSSOプローブにハイブリダイ

2つのパネルのプローブで同じハイブリダイゼーションのパターンを与える。位置37がDRB1*4043ではチロシン残基であるに対し、DRB1*4048ではセリン残基である点を除いて、DRB1*4048はDRB1*4043と同一である。上に示したプローブの示すパネルではこの多形は検出できないが、さらに対加的なプローブを使用すれば、完全な識別が可能となる。

例8

DR3, DR5, DRw6、およびDRw8のサブタイプ

DR3, DR5, DRw6、およびDRw8の「スプリット」についてのサブタイプは、各ハイドロタイプの各種対立遺伝子間を識別するプローブの使用により、同定できる。たとえば、DRw17 およびDRw18 の両者は "K-DR" プローブ CRX01にハイブリダイズするが、DRw17 のみが "Y" プローブ GH125 にハイブリダイズし、これでDRw17 は、DRw18 から識別できる。同様に、DRw1 およびDRw12 対立遺伝子(通常 DR6にして分類される)は互いに、また3つのDRw8対立遺伝子から、プローブの別の組み合わせを用いて識別できる。

「一般的」血清型1~10のHCTCと、同時にDR3, DR5, DRw6、およびDRw8サブタイプのHCTCから、DRB1特異的PCRプライマー-CH46/CH46で増幅したDNAを12のフィルターに適用した。これらのサンプルの血清DR型は既知であったから、本発明のこの構造を示すために、これらの対立遺伝子のサブタイプの決定に必要なプローブのみを使用した。結果は図5に示す。

図5に示す結果を得るために、約500 ngのHCTCゲノムDNAをDRB1特異的プライマー-CH46/CH46によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図4に示すプローブとハイブリダイズさせた。サンプルは、列Aでは、(1) No

- DNA control; (2) DR1 HCTC "KA59003"; (3) DR2 HCTC "SCHU"; (4) DRw17 HCTC "QBL"; (5) DRw18 HCTC "RSH"; (6) DR4 HCTC "BSM"; (7) DRw11 HCTC "SP0010"; (8) DRw12 HCTC "HERLUF"; (9) DRw13/DRw14 "KOS"; (10) DRw14 HCTC "AMALA"; (11) DRw15 HCTC "SLB"; 列B: (1) No DNA control; (2) DRw13 HCTC "HAG"; (3) DR PEV "BAR"; (4) DR7 HCTC "MOU"; (5) DRw8.3 HCTC "TAB"; (6) DRw8.1 HCTC "ARC"; (7) DRw8.2 HCTC "SPL"; (8) DR9 HCTC "DKB"; および(9) DRw10 HCTC "SHV"である。

GH66 ("YSTS")がDR3, DR5、およびDRw6にハイブリダイズし、GH102 ("YSTG")がDRw8にハイブリダイズすることを示す第一パネルのプローブのデータは図7に示す。

特表平6-505625 (18)

増幅した。増幅細胞系DNAを含む各フィルター(サンプルA～F)をDR1特異的HLA DRB プライマーで増幅したHTC DNAを含むする対照フィルター(サンプル1～11)と同時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて例1に記載のようにして調製した。結果は図6に示す。各フィルター対は、示したSSOプローブにハイブリダイズさせた。サンプルは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "BSM"; (6) DR5 (DRW11) HTC "SPO010"; (7) DRw6 HTC "OMW"; (8) DR7 HTC "MCU"; (9) DRw8 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DRw10 HTC "SHY"; (A) No DNA control; (B) Raji; (C) 616; (D) Beagle; (E) RM3; および(F) RS225である。

CRX12 プローブのシグナル強度は、すべてのサンプルが極めて良好に増幅されたことが明らかである。Raji, RM3, および RS225は、DRw10 に特異的なプローブ CRX34 にハイブリダイズする。サンプル616は、このサンプルが DR1 対立遺伝子を有することを考慮しない、プローブ CRX60 ("MIF") および CRX04 ("R") にハイブリダイズする。

細胞系 Beagle(は、DR7 プローブ CRX49 ("G-YK") および 2つの他のプローブ、GH66 ("YTS") および GH122 ("E") にハイブリダイズし、それは DR7 および DRW11 であることが示唆される。しかしながら、このサンプルからの推測される DRW11 対立遺伝子は CRX36 ("F-DR"; DRB1*1101) または CRX08 ("I-DR"; DRB1*1102) のいずれかにハイブリダイズすることが期待されたがせず、以下にさらに述べるように、DRW11 の新規な変異体であることが示唆される。

通常のリンパ球疾患群を有する患者には由来するこのサンプルは、この位置における多形の性質を決定するために、クローニングと配列を決定した。対立遺伝子の配列決定により、エビトープ "F-DR" をコードする第三の超可変領域に実際、配列多形のあることが示された。この対立遺伝子は DRB1*1103 として分類された(表3の配列 "Beagle" 参照)。プローブ CRX68 が第三の超可変領域のこの多形に特異的にハイブリダイズする(表4 参照)。

他のサンプルすべてでも GH66 "YTS" プローブにハイブリダイズし、したがって、これらは、DR3, DRW11, または DRW6 である。これらの他のサンプルは "E" プローブにハイブリダイズしないので、DR3 または DRW6 の可能性がある。しかしながら、このサンプルは、3つのDRW6対立遺伝子、DRB1*1301, DRB1*1302, および DRB1*1401 に共通に存在する配列を擁する。プローブ CRX68 ("I-DR") または CRX23 ("A-H") にハイブリダイズせず、DRW6ではなく DR3 であることが示唆される。

これを確認するために、このサンプルを DR1 特異的プライマー GH46/CRX37 で増幅し、DR3, GH125 ("Y") および CRX60 ("K-GR") について SSO で検査した。約 100 ng の細胞系ゲノムDNAを、例1の記載のようDRB1特異的プライマー GH46/CRX37 で

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。

図6に示すように、Raji, 616, RM3, および RS225 は "Y" および "K-GR" の両者にハイブリダイズし、これはそれらを DR3 (DRW11) に分類させる。要約すると、Raji, RM3, および RS225 は DRW10/DRW17 として分類される。RM3 および RS225 は Raji に由来する細胞系であるから、それらが同じ DR8 タイプを有していても驚くべきことではない。細胞系 616 は DR1/DRW17 として分類され、Beagle は DR7/DRW11 として分類されるが、上述のように、Beagle の細胞系は "F-DR" エビトープを有する DRB1*1103 対立遺伝子を有する。以前には、大部分の DRW11型細胞は "F-DR" エビトープを有する DRB1 対立遺伝子を有することが認められていた。したがって、Beagle の細胞系は DRW11型としては、異常に DRB1 対立遺伝子を有する。

細胞系サンプルに加えて、3つの異なる起源からのDNAを増幅し、分類した。一つの起源は、Center for Study of Human Polymorphism (CEPH, Paris, France) からの一連の無関係なヘテロ接合細胞の精製ゲノムDNAである(サンプル 665～863)。他の起源は膀胱癌患者の癌組織のmRNAから作成したcDNAであった(サンプル 2428, 2448, 2540, 2671, 2765)。正常ヒト膀胱細胞はクラスII分子を表現しないが、各種癌細胞ではクラスII分子の発現が記録されている。

残りのサンプル (PSV) は、口内粘膜で、DNAを精製することなく直接 HLA DRB について増幅した。完全なPCRタイピングには、サンプルを一般的 DRB プライマー GH46/90 および DRB1 特異的 PCR プライマー GH46/CRX37 の両者で増幅する。一般的プローブで増幅された DNAサンプルを有するフィルター片を第一のバトルのブ

ローブ(表4)で探し、DRB1特異的に増幅したDNAサンプルを含むするフィルター片は第二のバトルのプローブ(表5)で探しした。

表3および表8とのハイブリダイゼーションのパターンの比較により、サンプルの DRB 型を明確に説明することができる。ヘテロ接合サンプルの型判定の結果を図9に示す。図9では、プローブにハイブリダイズするサンプルは + の符号を示す。空欄はサンプルが特定のプローブとハイブリダイズしなかつたことを示す。

サンプル 665～863 は CEPH から提供された純粋なゲノムDNAである。サンプル "PSV" は口内粘膜から直接増幅されたサンプルである。このサンプルは 200 μl の 5% Chelex 中、95°C に 5 分間加熱した (Inger-Scheide: Amplifications 3; 11, 1989)。この溶液約 50 μl を直糞、反応容器 200 μl 中で増幅させて、一般的 DRB および DRB1 特異的増幅反応をサンプルにつき 30 サイクル実施した。

サンプル 2428, 2448, 2540, 2671, および 2765 は、膀胱癌 cDNA プレバーリーションから増幅した。膀胱癌サンプル 2428, 2448, 2540, 2671、および 2765 は、SSO GH125, CRX60, CRX56、および GH64 では分析しなかつた。これらのプローブは、DRB1 特異的プライマー GH46/CRX37 による増幅を要求するからである。CRX37 はイントロン配列に由来するので、cDNA の増幅には使用できない。ND は測定していない。

口内粘膜サンプル PSV は DRB1*10401 および DRW11 である。

これらのデータは本システムによれば、様々な起源から、標準構成ゲノムDNAから、mRNAから合成された cDNA から、異常な起源などとすれば口内粘膜もしくは 1 本の毛からの、ヘテロ接合 DNA のタイピングが可能であることを示している。

第四

DRB タイピング-逆ドットプロットフォーマット

本発明のこの実施形態においては、DRB プローブは膜に固定され、増幅された標的DNAは該結合プローブにハイブリダイズさせる。タイピングプローブのセットは、各プローブが、セット中の他のすべてのプローブと同じ速度および増幅速度で特異的標的配列にハイブリダイズする(そして同じ洗浄条件でハイブリダイズしたままである)ように設計される。PCR Protocol と題する本(筆者として本明細書に導入する)に記載されているように、增幅に用いられる PCR プライマーは、膜に結合したプローブにハイブリダイズした増幅DNAが容易に検出できるように、

ビオチン化される。

一実施形態においては、検出は、該結合プローブにハイブリダイズしたビオチン化、増幅DNAと、ストレートアビジョン (Ampli) 接合西洋ワサビペリオキシダーゼの反応によって行われる。すなわち、HRP は S-A-ビオチン相互作用を介して増幅されたDNAに結合され、よく知られた多様な手袋での発色、たとえばデトラメチルベンチジンの酸化によるなどては青色化合物の発生(米特許第 4,789,830 参照)。参考として本明細書に導入する)に使用できる。

プローブは膜に任意の手段で固定できるが、好ましい方法には、長さ約 13～26 のオリゴヌクレオチドプローブの、はるかに長い配列ポリ dT による「テイリング」がある。生成したポリ dT テイルはついで膜上のアミノ基と反応させてプローブを膜に共有結合で固定できる。この反応は紫外線照射によって促進される。

ターナーナルデオキシリボヌクレオチドランスマニラーゼ (TdT, Retagene Biochemicals; 以下の反応には約 120 単位/μl, 100 pmol/μl) に相当の濃度が規定される) はプローブ上にポリ dT テイルを創断るために使用できる。また、テイルをもつプローブは、布版の DNA シンセサイザーで合成することもできる。しかしながら、DNA シンセサイザーでテイルをもつプローブを作成する場合は、主としてテイル領域に最もしくない未熟チェーンターミネーションが起こらないように、プローブのが末端にテイルを配置すべきである。

TdT 反応は $1 \times TdT$ 液、200 pmol のオリゴヌクレオチド、800 μM dTTP、および 80 単位の TdT を含む約 100 μl の容液で行われる。10 μM TdT 液は 1000 nM カコシ酵母カリウム、10 mM 增強液 C/リト、2 mM ジオオスレイトール、250 mM Tris-HCl, pH 7.6 であり、Roychoudhury & Wu: Meth. Enzymol. 65: 43-62 の記載に従い(この記載は筆者として本明細書に導入する) 調整する。8 μM dTTP の 10 × 保存液液 (Retagene pH 7.0 に中和) を調製するのが便利である。

TdT 反応は 37°C で 2 時間行い、ついで 100 μl の 10 mM EDTA, pH 8 の添加により停止させた。テイルをつけたオリゴヌクレオチドの最終濃度は 1 μM (1 pmol/μl) であり、ホモポリマーテイルの長さは約 400 確認である。テイルの長さは dTTP とオリゴヌクレオチドのモル比を調整することによって変化させることができる。テイルをもつプローブは使用時まで -20°C で保存できる。

逆ドットプロットフォーマットには 2 種類の好みのナイロン膜がある。すな

特表平6-505625 (14)

わち *Streptomyces* TM ハイロン酵、乳酸0.45ミクロン (Paul製) および *Streptomyces* TM ハイロン酵、乳酸0.45ミクロン (ICI製) がある。プローブは、BioRed製のドットプロット装置 Bio-Radを用いて、初めて感度に既に上にスポットできる。各プローブは既に、独自の分離した部位にスポットする。ティルをもつプローブはそれ約6~10ムモルを約60~100 μl のTE緩衝液と混合したのち、ドットプロット装置に適用する。ドットプロット後、膜を短時間吸い取り紙に置いて染剤の液体を吸い取らせる。

ついで、膜を、たとえばStratagene製のStratalinker TM 光線ボックスのような紫外線ボックスの内側に置き、出力50~80ミリジュールに露出し、ティルをもつプローブをナイロン膜に固定化させる。膜を洗浄して、(ハイブリダイゼーション浴液中約15分) 非結合プローブを除去し、ついで膜をビオチン化PCR産物とハイブリダイズさせる。PCR産物 0.5~1 ピコモル (典型的なPCR検査 100 μl の4分の1~2分の1) を各プローブ/バトルに加えてハイブリダイズさせる。約50 μl のストレプトアビシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (SA-HRP, Recombinantly市販品入手可能)。Avanti Type TM α -DNA タイピングキットの指示マニュアル按照、参考として本明細書に導入する) 接合体をこの時点に添加するのが便利であるが、実験条件での洗浄について別例にSA-HRPの温度でのインキュベーションおよび洗浄を行なう方が良好なシグナルが得られる。

ハイブリダイゼーションは通常、水浴中、0.5% SDSおよび3 × 5 KSSPE、通常は4×からなるハイブリダイゼーション緩衝液を用いて、50°Cで30分間行う。実験条件での洗浄は、水浴中、0.1% SDSおよび1×SPEからなる洗浄液を用いて、50°Cで15分間行う。室温で1×PBSによる後洗浄を30分行うとシグナル量を増強できる。

逆ドットプロット法のためのビオチン化プライマーおよび本発明の他の有用なプライマーは以下に示す。しかしながら、一方または両者のプライマーを増幅中にビオチン化することもできるし、またプライマーは任意の検出フォーマットで増幅に使用してもよいことに留意すべきである。

プライマー	Seq.ID.No.	配列
CRX21	SEQ ID NO: 67	5'-TCTAGAAGTACTCTACOTCP-3'
CRX22	SEQ ID NO: 67	5'-CCGGATCCTTCOTOTCCGCAACAGACG-3'
CRX23	SEQ ID NO: 68	5'-CTCCGCCAACGCGGTAUTTGTGTCYCA-3'
DRB17	SEQ ID NO: 73	5'-GAATTCCCGGCGCGCGCT-3'
DRB30	SEQ ID NO: 107	5'-GAATTCCCGGCGCGCGCTCACCTP-3'
DRB12	SEQ ID NO: 228	5'-CCCCCTAGTTGTTCTTCAACACCGG-3'
DRB19	SEQ ID NO: 95	5'-GAATTCCCGGCGCGCTCACCTP-3'
DRB20	SEQ ID NO: 96	5'-GAATTCCCGGCGCGCTCACCTP-3'

日本はビオチンである。CRX11 (b), DRB1, DRB および DRB1 (133および14) ハロタイプのDRB1第二エクソンを増幅するためDRB10と使用するように設計された右端プライマーである。CRX20 はビオチン化左端プライマー GH46, CRX29 はビオチン化右端プライマー GH50, DRB17 はビオチン化右端プライマー CRX37 である。DRB30 は CRX37 の配列を含む、CRX31 とは異なり DRB31 は DR7 DRB1配列を複数できる以外は CRX37 と同じ DRB1第四を有する右端プライマーである。DRB152はDR7 および DR9 対立遺伝子のための群特異的右端プライマーである。DR219 および DR200は DRB1特異的増幅の範囲を DR2 および DR8 にまで延長するように設計され同じく右端プライマーである。

逆ドットプロット法に使用されるティルを付したプローブのハイブリダイゼーション領域を以下に示す。Xはイノシンである。DRB01/CRX60 のように2つのプローブ名が示されている場合は、最初の名称はティル付きプローブのハイブリダイゼーション領域 (示されている) を表し、第二の名称は HRP標識非テリングプローブを表示する。

プライマー	Seq.ID.No.	配列
CRX23	SEQ ID NO: 66	5'-CCTCTCTCGGAGCACTO
GH34	SEQ ID NO: 83	U 5'-GCTTTCAGCAAGACTC
GH56	SEQ ID NO: 86	5'-CAAGACGTAGACTCTCC
GH59	SEQ ID NO: 87	U 5'-CATGTTAACCTGCTCC
DRH02	SEQ ID NO: 89	5'-GAAATAACACTCACCCCTA
DRH04	SEQ ID NO: 90	5'-TGACACTCCCTCTTAGCT
DRH05	SEQ ID NO: 91	U 5'-CTTCAGCAGGATAAGTAT
DRH11	SEQ ID NO: 91	5'-TGAACGAAAGTAAGTTGA
DRH12	SEQ ID NO: 93	5'-CACTACTCTCATCAGG
DRH25	SEQ ID NO: 94	5'-CTGCCAGGTACCGCAC
DRB01/CRX60	SEQ ID NO: 79	5'-CAAACTTAACCTGCCAC
DRB02/CRX60	SEQ ID NO: 61	5'-CATCTCGAAACQDQC
DRB03/CRX35	SEQ ID NO: 71	5'-CCTCTTCAGGAAAT
DRB04/CRX49	SEQ ID NO: 74	5'-TCACTTTATACCTTACC
DRB05/CRX34	SEQ ID NO: 70	5'-CTCAAACCTAACCTCTC
DRB06/CRX04	SEQ ID NO: 60	5'-GAGCAAGGGGUCC
DRB07/CRX68	SEQ ID NO: 84	5'-GACTTGGAAACAGGA
DRB08/CRX12	SEQ ID NO: 63	5'-ACTGGGGGGGGGGCT
DRB09/CRX30	SEQ ID NO: 75	5'-CACCGGCGCCCGCTCT
DRB10/CRX33	SEQ ID NO: 76	5'-GAGCAAGGGGGCCC
DRB11/CRX15	SEQ ID NO: 64	5'-ACCTCGGCGGCGCTC
DRB12/CRX52	SEQ ID NO: 81	5'-ACATCTGAAACAGAAC
DRB13/CRX63	SEQ ID NO: 82	5'-ACATCTGAAAGACAGG
DRB14/CRX61	SEQ ID NO: 80	5'-GGGGCTAGCGGGGAGT
DRB15/CRX56	SEQ ID NO: 77	5'-GGGGTGTGAGAAGCT
DRB16/CRX57	SEQ ID NO: 78	5'-GGGGTGTGAGAAGCT
DRB19	SEQ ID NO: 97	5'-TGACACTTATACTTACCGTC
DRB20	SEQ ID NO: 98	5'-CTCAAACCTAACCTCTCC
DRB21	SEQ ID NO: 99	5'-GAGCAAGGGGGCCC
DRB22	SEQ ID NO: 100	5'-GCCTCTCCAGGAACT

DRB23	SEQ ID NO: 101	U 5'-GCGCGCTTCCTCTC
DRB24	SEQ ID NO: 102	U 5'-GAGCAAAACCGCGCC
DRB25	SEQ ID NO: 103	U 5'-CATCTCGGAAAGACAGG
DRB26	SEQ ID NO: 104	U 5'-CATCTCGGAAAGACAGGCGCG
DRB27	SEQ ID NO: 105	5'-ACATCTCGGAAAGACAGG
DRB28	SEQ ID NO: 107	5'-ACCTCGGCGCCCGCTC
DRB31	SEQ ID NO: 108	5'-CTCCCGTTATGATATATC
DRB32	SEQ ID NO: 109	5'-TCTCAGGTTACCGCA
DRB33	SEQ ID NO: 110	5'-ACTCAAGTTAACCTGCTCC
DRB34	SEQ ID NO: 111	5'-CTCATTTAACCTGCTCC
DRB35	SEQ ID NO: 112	5'-TCTGGCCGAGTCCCG
DRB36	SEQ ID NO: 113	5'-CGCTCTTCAGGAACT
DRB37	SEQ ID NO: 114	5'-CCCGCTTCAGGAACT
DRB38	SEQ ID NO: 115	5'-TCAACCGGCGCCGCTCT
DRB39	SEQ ID NO: 116	5'-GAGCAGAAGCGGGC
DRB40	SEQ ID NO: 117	5'-GAGKAGAAGCGGGCC
DRB41	SEQ ID NO: 118	5'-GGCCCGCTTCGCTC
DRB42	SEQ ID NO: 119	5'-GACGAGCTGGGGCGCC
DRB43	SEQ ID NO: 120	5'-GACTCTGGAGCGGGAG
DRB44	SEQ ID NO: 121	5'-GACCTCTGGAGCGGGAG
DRB45	SEQ ID NO: 122	5'-GACCGGAGGCGCG
DRB46	SEQ ID NO: 123	5'-TCAGAGTAAAGTACTCC
DRB47	SEQ ID NO: 124	5'-TCGACGAGGAAATAAGTATU
DRB48	SEQ ID NO: 125	5'-CACTCATTTAACCTGCTC
DRB49	SEQ ID NO: 126	5'-TCAGACTTACCGAGCTCC
DRB50	SEQ ID NO: 127	5'-TCAGACTTAAAGCGCTCC
DRB51	SEQ ID NO: 128	5'-GACGAGGCGCGAGC
DRB52	SEQ ID NO: 129	5'-GACGAGGAGCGAGGCG
DRB53	SEQ ID NO: 130	5'-GGCCCGCTTCGCTCCA
DRB54	SEQ ID NO: 131	5'-GCGCGCCCGCTTCGCTC
DRB55	SEQ ID NO: 132	5'-GACGAGGAGCGAGGCG
DRB56	SEQ ID NO: 133	5'-GAGAGAGGAGCGGGCC
DRB57	SEQ ID NO: 134	5'-CAACCGGCGCCCGCTCT
DRB58	SEQ ID NO: 135	5'-CATCTCGGAGAGAGCGGG
DRB59	SEQ ID NO: 136	5'-CATCTCGGAGAGAGAGG
DRB60	SEQ ID NO: 137	5'-GGCGCGCTAACCGCGCG
DRB61	SEQ ID NO: 138	5'-ACCTCTGGAGCGCGAGG

特表平6-505625 (16)

DRB62	SEQ ID NO: 139	S 5'-GACTTCTGGAGCCCGAG	DRB100	SEQ ID NO: 176	S 5'-TTCTTCACCAAGATAAATAGAG
DRB63	SEQ ID NO: 140	S 5'-CATCTTGAAAGCAGCGC	DRB101	SEQ ID NO: 177	S 5'-CTCCCTTATGGATATATAC
DRB64	SEQ ID NO: 141	U 5'-ACCTCGGGCCXCTCTG	DRB102	SEQ ID NO: 178	S 5'-CACTACTCTCTATACGAC
DRB65	SEQ ID NO: 142	U 5'-TAGCAAGAACGGCGG	DRB103	SEQ ID NO: 179	S 5'-CTCTCCAAAGTACCGCA
DRB66	SEQ ID NO: 143	U 5'-DAKAGAAAGCKGCGCG	DRB104	SEQ ID NO: 180	U 5'-ACCTCGGGCCCTCT
DRB67	SEQ ID NO: 144	U 5'-CTCGGGCCXCTCTG	DRB105	SEQ ID NO: 181	U 5'-AGGGGGGCCQAGGTGAC
DRB68	SEQ ID NO: 145	U 5'-CTCTCTGAGCGGCGAG	DRB106	SEQ ID NO: 182	U 5'-AQAGGGCGCCCGAACG
DRB69	SEQ ID NO: 146	U 5'-GCCCTCTCTCCAGGATG	DRB107	SEQ ID NO: 183	S 5'-AGAACGGGGCGCG
DRB71	SEQ ID NO: 147	U 5'-TCTTCAACCAAGATAAATGAT	DRB108	SEQ ID NO: 184	S 5'-GAACCGGGCGCG
DRB72	SEQ ID NO: 148	S 5'-GGCTCTCTCCAGGATG	DRB109	SEQ ID NO: 185	S 5'-DAAAGACAGGCGCGCGCG
DRB73	SEQ ID NO: 149	U 5'-AGAACGGGGCGCGCGCG	DRB110	SEQ ID NO: 186	S 5'-GCTGTCTCCAGGAGTCG
DRB74	SEQ ID NO: 150	U 5'-AGGAGGAAGCGCGCG	DRB111	SEQ ID NO: 187	S 5'-CTCAAGACGTAAGTACTAC
DRB75	SEQ ID NO: 151	U 5'-GAGCAAGAACGGCGGC	DRB112	SEQ ID NO: 188	S 5'-CCCTCTCTCGCGAACGCTG
DRB76	SEQ ID NO: 152	U 5'-CTCTCTGCTCCAGGAG	DRB113	SEQ ID NO: 189	S 5'-GACCTCTGAAAGACAGG
DRB77	SEQ ID NO: 153	U 5'-CTCTCTGAGCGAAGAAG	DRB114	SEQ ID NO: 190	U 5'-CTCTCTCTCCAGGAGTC
DRB78	SEQ ID NO: 154	U 5'-CTCTCTGAGCGAAGAAG	DRB115	SEQ ID NO: 191	U 5'-ACCGGGTTGGAGACGCTT
DRB79	SEQ ID NO: 155	U 5'-CTCTCTGAGCGAAGAAG	DRB116	SEQ ID NO: 192	U 5'-ACGGGGTTGGAGACGCTT
DRB80	SEQ ID NO: 156	U 5'-GGGGCCCGCTCTGTC	DRB117	SEQ ID NO: 193	U 5'-ACGGGGTTGGAGACGCTT
DRB81	SEQ ID NO: 157	U 5'-CGGGCCCGCTCTGTC	DRB118	SEQ ID NO: 194	S 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT
DRB82	SEQ ID NO: 158	U 5'-CTCTCTGCTCCAGGAGTC	DRB119	SEQ ID NO: 195	S 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT
DRB83	SEQ ID NO: 159	U 5'-ACCTCTGAGCGACAGAAG	DRB120	SEQ ID NO: 196	U 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT
DRB84	SEQ ID NO: 160	S 5'-GGGGCCCGCTCTGTC	DRB121	SEQ ID NO: 197	U 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT
DRB85	SEQ ID NO: 161	S 5'-GGGGCCCGCTCTGTC	DRB122	SEQ ID NO: 198	U 5'-AGAGGGCGGGCGACGCTT
DRB86	SEQ ID NO: 162	S 5'-GGGGCCCGCTCTGTC	DRB123	SEQ ID NO: 199	T 5'-GGGGCGGGCTGCGCGAGTA
DRB87	SEQ ID NO: 163	U 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT	DRB124	SEQ ID NO: 200	T 5'-CCACXCGGGCGGGCGCTCT
DRB88	SEQ ID NO: 164	U 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT	DRB125	SEQ ID NO: 201	T 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT
DRB89	SEQ ID NO: 165	U 5'-GAGGGCGGGCGACGCTT	DRB126	SEQ ID NO: 202	T 5'-ACGGGGCGGGCGCTCTC
DRB90	SEQ ID NO: 166	S 5'-AGAACGGGGCGGGCGG	DRB127	SEQ ID NO: 203	T 5'-GAGGGCGGGCGCTCTC
DRB91	SEQ ID NO: 167	S 5'-AGAACGGGGCGGGCGG	DRB128	SEQ ID NO: 204	T 5'-ACGGGGCGGGCGCTCTC
DRB92	SEQ ID NO: 168	U 5'-GGGGTTGGAGACGCTT	DRB129	SEQ ID NO: 205	T 5'-ATTCCTGAGAGACAGG
DRB93	SEQ ID NO: 169	U 5'-GGGGTTGGAGACGCTT	DRB130	SEQ ID NO: 206	T 5'-CCAAAGCTCTCTCTG
DRB94	SEQ ID NO: 170	S 5'-ACCTCGGGGGCGCTC	DRB131	SEQ ID NO: 207	T 5'-CAAGAGGAAAGACTTGGG
DRB95	SEQ ID NO: 171	S 5'-CATCTCTGAGACAGAGC	DRB132	SEQ ID NO: 208	T 5'-GAGGACAGGGCGGGCGG
DRB96	SEQ ID NO: 172	S 5'-GAGGAGAACGAGGCG	DRB133	SEQ ID NO: 209	T 5'-AAACACGGGGCGGGCGG
DRB97	SEQ ID NO: 173	S 5'-GGGGCGCTAGGGCGAGTAC	DRB134	SEQ ID NO: 210	T 5'-ATTCCTGAGAGACAG
DRB98	SEQ ID NO: 174	S 5'-GTAGGACCTCTCTG	DRB135	SEQ ID NO: 211	T 5'-ATTCCTGAGAGACAG
DRB99	SEQ ID NO: 175	S 5'-GTAGGACCTCTCTG	DRB136	SEQ ID NO: 212	T 5'-ACATGCTGAGAGACAG

DRB137	SEQ ID NO: 213	T 5'-CCCTCTTCCACGATG	DRB176	SEQ ID NO: 252	S 5'-GGGGCGGGCGCTCTG
DRB138	SEQ ID NO: 214	T 5'-CCAGAGAACGGGGCGG	DRB177	SEQ ID NO: 253	S 5'-CCAGAGAACGGGGCGG
DRB139	SEQ ID NO: 215	T 5'-CCAGAGAACGGGGCGG	DRB178	SEQ ID NO: 254	S 5'-GGGGCGGGCGCTCTG
DRB140	SEQ ID NO: 216	T 5'-CCAGAGAACGGGGCGG	DRB179	SEQ ID NO: 255	S 5'-GGGGCGGGCGCTCTG
DRB141	SEQ ID NO: 217	T 5'-CCAGAGAACGGGGCGG	DRB180	SEQ ID NO: 256	S 5'-GGGGCGGGCGCTCTG
DRB142	SEQ ID NO: 218	T 5'-CCAGAGAACGGGGCGG	DRB181	SEQ ID NO: 257	S 5'-GGGGCGGGCGCTCTG
DRB143	SEQ ID NO: 219	T 5'-CTGGGGCGGGCGCTCTG	DRB182	SEQ ID NO: 258	S 5'-CTACGGGGCGGGCGCTCTG
DRB144	SEQ ID NO: 220	T 5'-GCGAGGGGGGGGGGG	DRB183	SEQ ID NO: 259	S 5'-CTACGGGGCGGGCGCTCTG
DRB145	SEQ ID NO: 221	T 5'-CTGGGGCGGGCGCTCTG	DRB184	SEQ ID NO: 260	S 5'-GTCGGGGGGGGGGGAC
DRB146	SEQ ID NO: 222	T 5'-CTGGGGCTCCAGGAGTC	DRB185	SEQ ID NO: 261	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB147	SEQ ID NO: 223	T 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB186	SEQ ID NO: 262	S 5'-CTACGGGGGGGGGGGAC
DRB148	SEQ ID NO: 224	T 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB187	SEQ ID NO: 263	S 5'-CTACGGGGGGGGGGGAC
DRB149	SEQ ID NO: 225	T 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB188	SEQ ID NO: 264	S 5'-CAACCTCATGCCCC
DRB150	SEQ ID NO: 226	S 5'-TGTCGACCCGGGGGGGG	DRB189	SEQ ID NO: 265	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB153	SEQ ID NO: 229	S 5'-GAAATTCCCACTCAACAGGACT	DRB190	SEQ ID NO: 266	S 5'-GAGAACGGGGGGGGGGGG
DRB154	SEQ ID NO: 230	S 5'-GTTGTCGACCCGGGGGGGG	DRB191	SEQ ID NO: 267	S 5'-GTTGGGGGGGGGGGGGG
DRB155	SEQ ID NO: 231	S 5'-ACCCCGTAGTTGTCACAC	DRB192	SEQ ID NO: 268	S 5'-TTCGGGGGGGGGGGGGG
DRB156	SEQ ID NO: 232	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB193	SEQ ID NO: 269	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB157	SEQ ID NO: 233	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB194	SEQ ID NO: 270	S 5'-TCACGGGGGGGGGGGG
DRB158	SEQ ID NO: 234	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB195	SEQ ID NO: 271	S 5'-AGATACCTATATAACAG
DRB159	SEQ ID NO: 235	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB196	SEQ ID NO: 272	S 5'-AGACACCTATATAACAO
DRB160	SEQ ID NO: 236	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB197	SEQ ID NO: 273	S 5'-CTGTTTATAGAAAGTATCT
DRB161	SEQ ID NO: 237	S 5'-GAGGAGGGGGGGGGGG	DRB198	SEQ ID NO: 274	S 5'-CTGTCGGGGGGGGGGGG
DRB162	SEQ ID NO: 238	S 5'-GAGGAGGGGGGGGGGG	DRB199	SEQ ID NO: 275	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB163	SEQ ID NO: 239	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB200	SEQ ID NO: 276	S 5'-GAGGAGGGGGGGGGGG
DRB164	SEQ ID NO: 240	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB201	SEQ ID NO: 277	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB165	SEQ ID NO: 241	S 5'-ACCTTGCGGGGGGGGG	DRB202	SEQ ID NO: 278	S 5'-GAGGAGGGGGGGGGGG
DRB166	SEQ ID NO: 242	S 5'-ACCTTGCGGGGGGGGG	DRB203	SEQ ID NO: 279	S 5'-ACGGGGGGGGGGGGGG
DRB167	SEQ ID NO: 243	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB204	SEQ ID NO: 280	S 5'-CCUTCACCCGGGGGG
DRB168	SEQ ID NO: 244	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB205	SEQ ID NO: 281	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG
DRB169	SEQ ID NO: 245	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB206	SEQ ID NO: 282	S 5'-TCACGGGGGGGGGGGG
DRB170	SEQ ID NO: 246	S 5'-GAGGAGAACGGGGGGGG	DRB207	SEQ ID NO: 283	S 5'-AGACACCTATATAACCT
DRB171	SEQ ID NO: 247	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB208	SEQ ID NO: 284	S 5'-TGAACGAGGATAAAGTTGAC
DRB172	SEQ ID NO: 248	S 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG	DRB209	SEQ ID NO: 285	S 5'-TGAACGAGGATAAAGTTGAC
DRB173	SEQ ID NO: 249	S 5'-CTCTGAGGAGGAGGAGG	DRB210	SEQ ID NO: 286	S 5'-GAAATTCCCGGGGGGGGG
DRB174	SEQ ID NO: 250	S 5'-ACGGGGGGGGGGGGGG	DRB211	SEQ ID NO: 287	S 5'-GAATTCCCGGGGGGGGG
DRB175	SEQ ID NO: 251	S 5'-ACCTTGCGGGGGGGGG	DRB212	SEQ ID NO: 288	S 5'-GAAATTCCCGGGGGGGGG

特表平6-505625 (18)

DRB213	SEQ ID NO: 289	5'-ATGACACTCCCTCTTACGGCTG
DRB214	SEQ ID NO: 290	5'-ACATTCCTGGAAAGACCGAG
DRB215	SEQ ID NO: 291	5'-CCTCTCCCTCCATTTGAA
DRB216	SEQ ID NO: 292	5'-TTCAATAOAACCGAGCG
DRB217	SEQ ID NO: 293	5'-CAACCTGUAAGACGAG
DRB218	SEQ ID NO: 294	5'-GCTCTCTCCACGATG
DRB219	SEQ ID NO: 295	5'-CCCTCCCTCCAGGATG
DRB220	SEQ ID NO: 296	5'-GCTCTCCAGGATG
DRB221	SEQ ID NO: 297	5'-CTTGCCCGAAGCTG
DRB222	SEQ ID NO: 298	5'-CTGTCACGTACCGCA
DRB223	SEQ ID NO: 299	5'-GGDGGCTAGGCGAG
DRB224	SEQ ID NO: 301	5'-CAACKCGGCCCGCTTCT
DRB225	SEQ ID NO: 301	5'-GAAGGGGGCGCGGT
DRB226	SEQ ID NO: 302	5'-ACCGGGGGGGCGCTC
DRB227	SEQ ID NO: 303	5'-GAACGCGGGGGCGGT
DRB228	SEQ ID NO: 304	5'-ACCGGGGGGGCGCTC
DRB229	SEQ ID NO: 305	5'-ACTTCTGGAAAGACAGG
DRB230	SEQ ID NO: 306	5'-GACCTCCCTGAAAGACAGG
DRB231	SEQ ID NO: 307	5'-CATCTCTGAAAGACAGG
DRB232	SEQ ID NO: 308	5'-GACATCTGGAAAGACAGG
DRB233	SEQ ID NO: 309	5'-ACATCTGGAAAGACAGG
DRB300	SEQ ID NO: 310	5'-AATTCCCCGGCGCTCTACCTC
DRB301	SEQ ID NO: 311	5'-GAATTACACGGGACTCCAGGC

予備試験の結果、「S」をマークした上記プローブは他の「U」とマークした上記プローブよりも好ましいことがわかつてゐる。「T」をマークした上記プローブは未だ試験されていない。

好ましい逆ドットプロットについてのハイブリダイゼーションパターンおよび特異性(1989対立遺伝子セレクト)を以下に示す。「特異性」のカラムに使用される「X」のマークは、*印の後の始めの2つの数字を指示されるすべての対立遺伝子を包含することを表す。

エピトープ	名前	規則性
W-L-F	CRX6MAB01	DRB1*0101, 0102, 0103
W-P-R	GH104	DRB1*0101, 1302, 1601, 1602
Q-D-Y	DRB100	DRB1*0101, 0102, 0201, 0202
K-D-P	GH111	DRB1*0001
Y-S-T-S	DRB46	DRB1*030X, 110X, 130X, 140X
V-H	DRB48	DRB1*040X
G-Y-K	DRB19	DRB1*070X
E-V	DRB20	DRB1*1001
I-R-S	GH37	DRB3*0101
L-L-S	GH58	DRB3*0201, 0202, 0301
R-D-R	DRB37/DRB109	DRB1*0801, 0802, 1101, 1104, 1601, PEV;
		DRB3*0101, 0102
P-D-E	CRX43	DRB1*1103
I-D-S	CRX6M/DRB01	DRB1*0103, 0402, 1102, 1301, 1302
I-D-K	DRB37	DRB1*1303
R-R	DRB45	DRB1*1001
P-R-R-E	DRB52	DRB1*0901
I-A	DRB69	DRB1*1501, 1502; DRB5*0201, 0302
Y	DRB103	DRB1*0301, DRB3*0101
E	DRB108	DRB1*110X
S	DRB40	DRB1*0405, 0501, 0803, 1303
A-H	DRB112	DRB1*1401, LY10
V-S	DRB35	DRB1*070X, 0901, 1201; DRB3*0101, 0301
R	—	DRB1*0101, 0102, 0404, 0405, 0408, 1402
K	—	DRB1*0401
R-B	—	DRB1*0403, 0406, 0407
RR-E	—	DRB1*1401, LY10; DRB4*0101
I-D-I	DRB72	DRB1*0701, 0702
I-D-R	DRB95	DRB1*0803, 1201
K-G-R	—	DRB1*0301, 0302; DRB3*0101
DR	DRB113	DRB1*1602
G (pos. 86)	—	幾5夢類
V (pos. 86)	—	幾5夢類

エピトープ	名前	規則性
AV (pos. 86)	—	DRB1*0102, 1201; DRB5
W/M/N	GH31	DRB4*0101
B/K/R	DRB101	DRB2*0101

例題

逆ドットプロットタイプグリッド

迅速かつ簡単な逆ドットプロットハイブリダイゼーションフォーマットが挿入された HLA DRBタイピングキットは、対立遺伝子特異的な増幅を含めた精緻なハイブリディングを進めるに先立ち、サンプルの準備かつ迅速なブレスクリーニングを行なうために設計されたものである。このキットは、増幅試験、陽性対照として使用されるDNA、プローブが予め固定化されているナイロン片、着色検出試薬、試験管および指示書を含む。

タイピングは2回の増幅反応を用いて行われ、一つには DRB一般プライマー、他方には DRB特異的プライマーを用いた。このプライマー対は、同じ熱サイクル条件下で最適化したがって、2つの反応は同時に実行できる。2つのペアのプローブは、一つは各増幅反応に特異的で、逆ドットプロットハイブリダイゼーションフォーマットに使用された。プローブのペアはそれぞれ、取り扱いが容易にするため、同一のナイロンストリップ上に固定化した。

ビオデン化プライマーを増幅反応に使用したので、上記例8に記載したような比色検定を用いる以後の検出が可能となった。使用された DRB增幅プライマーは CRX28 (SEQ ID NO: 87) および CRX29 (SEQ ID NO: 88) であった。DRB1増幅プライマーは CRX28およびCRX37 (SEQ ID NO: 73) であった。両セットのプライマーとも上記例8に記載されている。

2つのプローブペア、すなわち一方は DRB増幅の増幅産物とのハイブリダイゼーション用、他方はDRB特異的増幅の増幅産物とのハイブリダイゼーション用は、以下に示す。各プローブの又クロマチド配列は配列図範囲に掲げるが、各プローブの配列固定番号 (SEQ ID NO) は以下に示す。

DRB増幅のためのプローブペア

プローブ	Seq ID No.	A/A配列	反応液
1 DRB901	SEQ ID NO: 79	WLP	DR1
2 GH104	SEQ ID NO: 90	WPR	DR2
3 DRB46	SEQ ID NO: 123	YSTS	DR3, 11, 13, 14
4 DRB48	SEQ ID NO: 125	V-H	DR4
5 DRB207	SEQ ID NO: 283	G-YK	DR7
6 GH102	SEQ ID NO: 89	YSTG	DR4, 12, 1404
7 DRB209	SEQ ID NO: 285	K-D-F	DR9
8 DRB210	SEQ ID NO: 98	EV	DR10
9 DRB102	SEQ ID NO: 178	E	DR11
10 DRB112	SEQ ID NO: 188	A-H	1401, 1404
11 DRB07	SEQ ID NO: 34	F-DR	1103
C DRB42	SEQ ID NO: 119	DRCLGRP	全

DRB増幅のためのプローブペア

プローブ	Seq ID No.	A/A配列	反応液
12 DRB213	SEQ ID NO: 289	S	+
13 DRB37	SEQ ID NO: 114	F-DR	+
14 DRB401	SEQ ID NO: 279	R	-
15 DRB163	SEQ ID NO: 239	K	0401, 0409
16 DRB118	SEQ ID NO: 194	R-E-R-E	▲
17 DRB01	SEQ ID NO: 61	I-DE	▲
18 DRB38	SEQ ID NO: 115	K-G-R	DR3
19 DRB222	SEQ ID NO: 298	Y	0301
20 DRB232	SEQ ID NO: 298	I-DR	13/3
21 DRB136	SEQ ID NO: 212	I-DR	0803, 1201 (not DR7)
22 DRB198	SEQ ID NO: 274	V-S	DR7, 0803, 1201
C DRB42	SEQ ID NO: 119	DRCLGRP	全

* 配列は多数の異なる対立遺伝子上に認められる (DRB1アミノ酸アライメント参照)。

DRB プローブ1～8はほぼアミノ酸9～13の領域に特異的であり、プローブ9はアミノ酸8に特異的であり、プローブ10はアミノ酸67～80に特異的であり、プローブ11はアミノ酸87～94に特異的である。DRB1プローブ13～18, 20, および21はアミノ酸67～74に特異的であり、プローブ12はアミノ酸57に特異的であり、プロ

特表平6-505625 (17)

ーブは20アミノ酸28に特異的であり、プローブ22はアミノ酸67～60に特異的である。対照プローブはアミノ酸1～50に特異的である。

上記パネルに示したプローブは標識して、例7に記載の DRBダイピング方法に使用できることに留意すべきである。同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。

キットは2つの箱にパッケージされた。一つの箱には DRB試薬を、他の箱には DRB1試薬を供給した。各箱にパッケージされたものは、DRBまたはDRB1 PCRミックス、DNAコントロール、およびダイピングストリップ：8 mM塩化マグネシウム溶液；缓冲液；SA-HRP接合体；発色液(TMB)；反応管；ならびに指示書であった。PCRは塩化マグネシウムおよび純型DNAを除くPCRに必要な試薬を含有する。記載の方法の実施に必要な他の試薬および耗材はキットユーザーによって供給され、すべて一般に市販されていた。

PCR増幅に使用するのに適したサンプル前処理操作はいくつか、本技術分野において既知である。好ましい操作は、Singer-Sternberg: Amplification 3:11, 1988、および Tatchell: BioTechniques 10(4): 606-613, 1991 に記載された（同記載とも参考として本明細書に導入する）Chelex 抽出法である。生物学的サンプルから核酸を抽出する他の技術の例には、Sambrookら: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)；Arrend: Preparation of Nucleic Acids Probes, pp 18-30; In: Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (Ramas & Higgins編, IRL Press, 1985)；または PCR In Protocols, 18～20章 (Immunolab, Academic Press, 1989) の記載がある。すべて参考として本明細書に導入する。

すべての DRB配列を増幅するためおよびDRB1配列を特異的に増幅するためのプライマー対は、2つの別個の PCR反応に使用される。増幅反応は Saikiら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6230-6234, 1983 の記載（参考として本明細書に導入する）に基づいて、以下のように改変して行う。

反応は線溶菌 100μl 中サンプル27μl を用いて実施する。各反応は、50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5mM MgCl₂, 10 μg のゼラチン、各 200 μM の dATP, dCTP, dGTP および dTTP, 0.2 μM の各オリゴデオキシリボヌクlease (PEO) を含有させる。

で、旋回振盪機上約50rpm で5分間インキュベートし、ウエルを再び吸引する。

ストリップを含む各ウエルに、3ml の洗浄／酵素接合体27μl の溶液から）を加える。トレーを表面で、旋回振盪機上約50rpm で20分間インキュベートする。各ウエルから溶液を吸引し、ストリップを10ml の洗浄液中、室温、旋回振盪機上約50rpm で5分間洗浄する。最後に、洗浄液を各ウエルから吸引し、ついでストリップを発色工程に移す。

発色工程は DRBおよびDRB1の両者について同じである。各ウエルに10ml のグエン酸緩衝液 (100mMグエン酸ナトリウム, pH 5.0) を加え、トレーを約50rpm の旋回振盪機上に置く。好ましくは発色溶液はこの間に調製する（使用前10分以内）。各ウエルの発色溶液は、10ml のグエン酸緩衝液、10μl の3%過酸化水素、および0.5ml [TMB] 色素原溶液 (PEO) から市販されている）を種やかに（泡を起きさせない）混合する。トレーを旋回振盪機からはずし、グエン酸緩衝液を吸引し、新たに作成した発色液10ml を各ウエルに加える。トレーは、発色工程の始めから、アルミホイルのカバーを用いて遮光する。ストリップは、室温、旋回振盪機上約50rpm で30分まで発色させる。所望のシグナル強度が得られたならば直ちに、発色工程は終結させることができる。

所望のシグナル強度が達成されたならば、トレーを旋回振盪機からはずし、各ウエルの内容を吸引する。各ウエル内を10s の脱イオン水で洗浄して発色を停止させる。水を加え、トレーを室温、約50rpm の旋回振盪機上で5分間振盪し、各ウエルの内容を徐々に洗出す。少なくとも3回洗浄しなければならない。

ストリップは、ダイピングトレー中に返却して、2℃～8℃で2～3日間保存できる。ストリップは満満時に永久保存用に撮影する。ストリップは、カザガに褐色はするが、乾燥して専用に保存することもできる。結果は、DNA プローブストリップ上の青色のドットのパターンを読み取る。それぞれの青色ドットは、オリゴデオキシリボヌクleaseが固定化プローブとハイブリダイズしたことを意味する。すべての DRB対立遺伝子を検出する内部対照プローブ (DRB2) は、ストリップ上の他の陽性ドットの強度と同等もしくはそれより弱い強度のドットを產生するように設計する。これは、陽性と評価すべき最低のドット強度を指示する。

上記キットのプローブは、91のDRB1タイプを識別する。これらのプローブで定

向増幅反応には同一の温度プロファイルを使用し、同反応を同じサーモサイクルで同時にを行うことが可能にする。サーモサイクラーは、以下の温度プロファイル、すなわち80℃で50秒間変性、80℃で30秒間アニーリング、70℃で80秒間延伸の35サイクルにプログラムする。サーモサイクラーは、最後のサイクルに統じて70℃でさらに7分間サンプルをインキュベートするようにプログラムする。

PCRからの増幅DNAは二重鎖の、オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするように変性されなければならない。増幅DNAはサーモサイクラー中の95℃で5～10分間変性し、その温度に使用時まで保持する。別法として、変性した増幅DNAを85℃の温度から直接氷浴中に移すことができる。急速な冷却は、DNAを変性型で安定化する。増幅DNAは、ハイブリダイゼーションが行われるまで、氷浴中に保持する。

2種のライコン調ストリップのそれぞれに12種のプローブを付着させる。一方のストリップは DRB増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含むし、他のストリップはDRB1特異的増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含む。ハイブリダイゼーション反応は、それぞれのプローブを含むストリップを別個のウエル中に保持するトレー中で行われる。ハイブリダイゼーショントレーは PECI から市販されている。通常、キットで供給される。以下に記載するハイブリダイゼーション条件は DRBハイブリダイゼーションに特異的である。DRB1 DNA/ハイブリダイゼーションプロトコールは DRBプロトコールとは、DRBハイブリダイゼーションが60℃ではなく65℃で行われる点で異なる。プロトコールの他の点はすべて同一である。

ストリップを含む各ウエルは、予め加温したハイブリダイゼーション溶液 (4 ×SSPE および 0.5% 蛋白質 SDS) 3 ml、ついで25μl の増幅DNAを加える。トレーの内容を混ぜ深く混ぜ下後、トレーを50℃の培養水浴中に入れ50℃、約50 rpm で20分間インキュベートする。

ストリップは最初、緊締条件下的洗浄の前に洗浄液 (1.0%SSPE および 0.1% 蛋白質 SDS) 10 ml 中、室温で数秒間洗浄し、各ウエルを吸引する。紧締洗浄の温度および時間には特に制限はない。予め加温した洗浄液 (10 ml) を各ウエルに加え、トレーを 60℃の温水浴中約50 rpm で 12(±2) 分間インキュベートする。各ウエルを吸引した後、各ウエルに10 ml の洗浄液を加え、トレーを室温

で、旋回振盪機上約50rpm で5分間インキュベートし、ウエルを再び吸引する。

ストリップを含む各ウエルに、3ml の洗浄／酵素接合体27μl の溶液から）を加える。

トレーを表面で、旋回振盪機上約50rpm で20分間インキュベートする。各ウエルから溶液を吸引し、ストリップを10ml の洗浄液中、室温、旋回振盪機上約50rpm で5分間洗浄する。最後に、洗浄液を各ウエルから吸引し、ついでストリップを発色工程に移す。

発色工程は DRBおよびDRB1の両者について同じである。各ウエルに10ml のグエン酸緩衝液 (100mMグエン酸ナトリウム, pH 5.0) を加え、トレーを約50rpm の旋回振盪機上に置く。好ましくは発色溶液はこの間に調製する（使用前10分以内）。各ウエルの発色溶液は、10ml のグエン酸緩衝液、10μl の3%過酸化水素、および0.5ml [TMB] 色素原溶液 (PEO) から市販されている）を種やかに（泡を起きさせない）混合する。トレーを旋回振盪機からはずし、グエン酸緩衝液を吸引し、新たに作成した発色液10ml を各ウエルに加える。トレーは、発色工程の始めから、アルミホイルのカバーを用いて遮光する。ストリップは、室温、旋回振盪機上約50rpm で30分まで発色させる。所望のシグナル強度が得られたならば直ちに、発色工程は終結させることができる。

所望のシグナル強度が達成されたならば、トレーを旋回振盪機からはずし、各ウエルの内容を吸引する。各ウエル内を10s の脱イオン水で洗浄して発色を停止させる。水を加え、トレーを室温、約50rpm の旋回振盪機上で5分間振盪し、各ウエルの内容を徐々に洗出す。少なくとも3回洗浄しなければならない。

ストリップは、ダイピングトレー中に返却して、2℃～8℃で2～3日間保存できる。ストリップは満満時に永久保存用に撮影する。ストリップは、カザガに褐色はするが、乾燥して専用に保存することもできる。結果は、DNA プローブストリップ上の青色のドットのパターンを読み取る。それぞれの青色ドットは、オリゴデオキシリボヌクleaseが固定化プローブとハイブリダイズしたことを意味する。すべての DRB対立遺伝子を検出する内部対照プローブ (DRB2) は、ストリップ上の他の陽性ドットの強度と同等もしくはそれより弱い強度のドットを產生するように設計する。これは、陽性と評価すべき最低のドット強度を指示する。

上記キットのプローブは、91のDRB1タイプを識別する。これらのプローブで定

位置86のが異なる対立遺伝子が

DRB1*1501 and DRB1*1502
DRB1*0302 and DRB1*0303
DRB1*0403 and DRB1*0407
DRB1*0404 and DRB1*0408
DRB1*1101 and DRB1*1104
DRB1*1301 and DRB1*1302
DRB1*0802 and DRB1*0804

四〇

一般DR31タイピング輸送II

例4には、DRB1対立遺伝子のダイピングの戦略を記載した。ここには、別の戦略を記載する。DRB1遺伝子座におけるすべての45+対立遺伝子の完全な鑑別を達成するためには、2段階検定が使用される。第一段階は、全サンプルの DRB-般プライマー、G1H6およびG1H5による塩縛である。得られた PCR産物を固溶化し、どの対立遺伝子特異的塩縛を実施する必要があるかおよび第二の段階でスクリーニングすべき塩縛産物を決定するために、第一バチルのプローブで検査する（例4と同じにして）。塩縛およびハイブリダイゼーションプロトコールは例4とは同様である。対立遺伝子異常性を参照したハイブリダイゼーションパターンの判定は、各プローブバチルについて述べる。

第一段階タイピング

プローブの第一のパネルは、表4に示したプローブパネルと、2、3のプローブが異なるだけで、類似している。以下のプローブパネルに示す対立選択子特性中、対立選択子記号の最後の文字としてのXは、特記され次番号を始まるすべての対立選択子が認識されることを指示する。たとえば、030Xは、0301, 0302 および0303と同一である。

HLA DRB タイピング SSO プローブの第一のパルス				
クローバー	SEQ ID NO:	エピトペ	純度	純度 (SSPE, %)
CMX33	SEQ ID NO: 69	"A-L-F"	010X	0.4X, 42
CH104	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	150X, 160X	0.3X, 42
GM36	SEQ ID NO: 84	"YTS"	030X, 110X,	0.2X, 42
			130X, 140I, 140Z	
CRX39	SEQ ID NO: 87	"V-H"	041X	0.2X, 42, 20
CRX49	SEQ ID NO: 74	"G-YK"	070X	1.0X, 42
GH102	SEQ ID NO: 69	"YSTG"	080X, 130X, 1404	0.1X, 42
GS111	SEQ ID NO: 92	"K-D-F"	090I	0.6X, 42
CRX34	SEQ ID NO: 70	"EV"	100I	0.4X, 42
GH122	SEQ ID NO: 93	"E"	110X	0.3X, 42
CRX61	SEQ ID NO: 60	"S"	0413, 0409, 0410, 0411, 0801, 0803, 1304, 1305	0.1X, 42
CRX23	SEQ ID NO: 66	"A-H"	140I, 1404	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	"T-DR"	010D, 0402, 110Z, 130I, 130L, 1304	0.1X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	"F-DR"	160I, 110I, 1104, 1303, 0801, 0802, 0804, 1202	0.3X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	"T-DR"	1103	0.2X, 42
CRX62	SEQ ID NO: 81	"W-DK"	1203	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB "全"	全	0.2X, 42

プローブをハイブリダイスレ、ついで、42°Cで20分恒温浄するGK対を除き、42°Cで15分恒温浄する。SSPC溶液はすべて 0.1% SDS を含むする。各プローブは、6'末端で HRP に接合させる。第一のプローブ・パヌルから得られたハイブリダイゼーションパターンに基づいて、サブタイピングこうていには対立遺伝子特異的検査が必要になる。

DR7, DR9, およびDR10の各タイプは固定できる唯一の対立遺伝子しかなく、第一和敵のプローフパネルから直接同定できる。実際、DR7タイプを特徴する対立遺伝子には、DR81+0701 およびDR81+0702 がある。しかししながら、これらの2つの対立遺伝子は第三のエクソンのみで異なり、第二のエクソンからの配列を標準および検出する本方法では見出できない。したがって、本実験の方法では唯一の明確な対立遺伝子が固定できる。

第二段階タイピング

四

すべてのタイプが血清学的に DR2 である、W-P-R (SH104) に対する陽性シグナルを有するサンプルは W-P-RJ ピトープを有する対立選択子に特異的なブライマーワーク、AB33 のおよび AB60 を增幅される。得られた生成物は以下のパネルで検索される。

RA 002 タイピング SS0'プロ

プローブ	SEQID NO.	エピトープ	封入済数	放散(SPECIFIC)
DRA03	SEQ ID NO: 140	"A"	130X	0.1X, 41
DRA013	SEQ ID NO: 149	"D"	160Z	0.1X, 41 or 0.4X, 3G
CKX03	SEQ ID NO: 73	"PDK"	160I	0.2X, 41
CKX07	SEQ ID NO: 78	"V"	150I, 150A	0.2X, 41
CKX08	SEQ ID NO: 77	"S"	150Z, 160X	0.2X, 41
DRA036	SEQ ID NO: 272	"F"(30)	150J	1.0X, 41
DRA017	SEQ ID NO: 273	"F"(30)	150I, 150Z, 160X	1.0X, 41
CKX04	SEQ ID NO: 90	"W-Y-L"	DRX	0.1X, 41
CKX12	SEQ ID NO: 63	DNA "	+	0.2X, 41

示されたプローブは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。SSPE 液液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、既未焼却 HRP に接着させる。

082 085 093

プローブG45ではエピトープGSTに対する導性シグナルを含むするサンプルは、DR3, DR5, またはDR6のいずれかである。これらの対立遺伝子は、MR2およびMR80で特異的に検出される。これらの対立遺伝子は、以下のプローブパネルを用いて鑑別できる。

HLA DR3, 5, w6タイピング SSOプローブ

プロトコル	SEQ ID NO:	エピトープ	既知抗原子	活性(SIPE)
CX05	SEQ ID NO: 75	KGR	030K	0.2X, 42
CH125	SEQ ID NO: 94	Y	030I	0.3X, 42
DRB100	SEQ ID NO: 256	A	030X, 1301, 1302, 1303, 1402, 1403, 1404	0.2X, 42
GH123	SEQ ID NO: 93	E	130K	0.2X, 42
CRX65	SEQ ID NO: 80	S	1303, 1304	0.2X, 42
CRX23	SEQ ID NO: 54	A-H	1401	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	I-DK	1102, 1301-03	0.3X, 42
CRX53	SEQ ID NO: 91	T-DK	1305	0.2X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	RDE	1103	0.2X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	FDK	1101, 1104, 1305	0.2X, 42
CRX04	SEQ ID NO: 66	X	1402	0.1X, 42
CRX57	SEQ ID NO: 78	V	030X, 0303, 1102, 1104, 1303, 1304, 1305, 1403	0.2X, 42
CRX58	SEQ ID NO: 77	G	0302, 1101, 1302, 1303, 1305, 1402, 1403	0.1X, 42
GH36	SEQ ID NO: 86	YSTS	DRL, DRT, DR-w6	0.2X, 42

示されたプローブは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。SSPE 液波はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、5'末端で biotin 接合させる。

プローブGH58とVHエビトープに対する属性シグナルを共有するサンプルは GH4 である。これらの対立遺伝子は、AB64およびAB67で特異的に増幅される。これらの対立遺伝子は、以下のプローブパネルを用いて検出できる。

表平6-505625 (19)

プローブ	エピトープ	対立遺伝子	位置	プローブ	エピトープ	対立遺伝子	位置(SPE, T)
CRX61	S	0405, 0409, 0410, 0411	0.3X, 42	CRX33	WLS	010X	0.4X, 42
CRX64	X	0401, 0409	2X, 40	CRX04	R	0101, 0102, 0403, 0404,	0.1X, 42
CRX04	R	0403, 0404, 0403, 0406,	0.1X, 42			0405, 0406, 0407, 0408,	
		0407, 0408, 0410, 0411				0410, 0411	
CRX15	R-E	0403, 0405, 0407, 0411	0.4X, 55	CRX06	EDE	0103, 1101, 1301, 1302	0.2X, 42
CRX06	DE	0402		CRX37	V	0301, 0401, 0403, 0404,	0.2X, 42
CRX37	V	0402, 0403, 0404, 0405,	0.2X, 42			0406, 0410, 0411, 1102,	
		0410, 0411				1103, 1204, 1301, 1304,	
CRX56	G	0401, 0405, 0407, 0408,	0.2X, 42			1401, 1404, 1403, 0804	
		0409		DRB1*12	AV	0102, 1201, 1202	0.1X, 42
OH59	V-H	DR4	0.2X, 42	CRX56	G	0101, 0103, 0901, 0401,	0.2X, 42
CRX12	DRB* 全	全	0.2X, 42			0405, 0407, 0408, 0409,	

示されたプローブは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。ただし、GH68の場合は例外で、42°Cで20分間洗浄する。SPE洗浄溶液はすべて0.1% SDSを含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

DR1, DR6, および DRW12

プローブ CRX33 で NLF エピトープに対する属性シグナルまたはプローブ GH102 で YSTGエピトープに対する属性シグナルを含有するサンプルは DR81 特異的プライマー GH46 および CRX37 で增幅される。これは、DR2, DR7, および DR9 を除きすべてのDRB対立遺伝子も増幅する。対立遺伝子は、ついで、以下に示すプローブペアを用いて識別できる。

CRX33	WLS	010X	0.4X, 42
CRX04	R	0101, 0102, 0403, 0404,	0.1X, 42
		0405, 0406, 0407, 0408,	
		0410, 0411	
CRX06	EDE	0103, 1101, 1301, 1302	0.2X, 42
CRX37	V	0301, 0401, 0403, 0404,	0.2X, 42
		0406, 0410, 0411, 1102,	
		1103, 1204, 1301, 1304,	
		1401, 1404, 1403, 0804	
DRB1*12	AV	0102, 1201, 1202	0.1X, 42
CRX56	G	0101, 0103, 0901, 0401,	0.2X, 42
		0405, 0407, 0408, 0409,	
		1101, 1202, 1303, 0801,	
		0402, 0903, 1305, 1402,	
		1403	

示されたプローブは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。SPE洗浄溶液はすべて0.1% SDSを含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

プローブによって認識されるエピトープの一例は多くの対立遺伝子によって共有されるので（たとえばPDR）、上記プローブペアとのハイブリダイゼーションパターンから導かれる結果は、プローブがDR1, DR6, もしくはDRW12に陽性するか、またはDR81特異的プライマーで同様に増幅される他の対立遺伝子が陽性するかを決定するためには、ほかの対立遺伝子特異的増幅と比較される。NLF および YSTGエピトープはタイミングの結果の判定を単純化する。

図11

ヘテロ接合体の対立遺伝子サブタイピング

例10のプローブペアとのハイブリダイゼーションパターン单独では、ある種のヘテロ接合体に存在する対立遺伝子の明確な決定には不十分である。プローブ

のハイブリダイゼーションパターンは、サンプル中にどの対立遺伝子エピトープが存在するかは指示するが、存在する特異的対立遺伝子を決定するには、どのエピトープがどの対立遺伝子に存在するかを知る必要がある。通常、エピトープ起源は、対立遺伝子の組み合わせの可能性に限定があるので、推測可観で、このよう不明瞭はほとんどない。起こることがある場合は対立遺伝子特異的増幅を用いて解決される。

DR6/DR6ヘテロ接合体では、以下のプローブパターンが起こり得る。

・プローブ GH46 + DRH12 + DRB1*08 + CRX04 + CRX33 + CRX37
エピトープ YSTG S DA E-DE F-DR G V

3つの異なるDR6/DR6ヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせは、このプローブハイブリダイゼーションパターンを生じる。これらの組み合わせを以下に掲げる。これらへのヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせは他のプローブでは識別できない。

DRB1*1101 および DRB1*1301
DRB1*1104 および DRB1*1302
DRB1*1102 および DRB1*1305

これらの可能性を識別するためには、位置88における独特的二形性を利用する他のプライマーが設計された。DR81対立遺伝子はすべて、位置88にパリンまたはブリシンを含有する。上に挙げた各ヘテロ接合体では、一方の対立遺伝子は位置88にパリン、他方はブリシンを含有する。DRB1*1001, DRB1*1104, および DRB1*1102はそれぞれ位置88にパリンを、DRB1*1101, DRB1*1302, および DRB1*1305はそれぞれグリシンを含有する。VまたはG特異的プライマーを群特異的プライマー (M-PK, VI, またはYSTG) と組み合わせて用いた増幅では、位置88における多形に基づいた單一対立遺伝子の増幅が可能になる。この方法で、各ヘテロ接合体に存在する2つの対立遺伝子の一方を選択的に増幅することが可能で、直接プローブハイブリダイゼーションによって決定できる。第二の対立遺伝子は、可能な対立遺伝子の組み合わせに基づく第一の対立遺伝子の知識から推定できる。

单一対立遺伝子増幅によるDR6/DR6ヘテロ接合体のサブタイピングは、PCRプライマー対 A882/RAP05およびA882/RAP08を用いて達成された。増幅は、PCR緩衝液に最終濃度1.0 mM MgCl₂を添加したほかは例10と同様に実施した。サーモサイクラーは35サイクルにプログラムした。温度プロファイルは、94°Cにランプ、94

で30秒間変性、30秒間アニーリング、および70°Cで延長とした。プローブハイブリダイゼーションは前述の通り行った。V-特異的(RAP05) およびG-特異的(RAP06) プライマーは以下に、また配列掲載部に示す。それぞれA882と組み合わせて使用したが、他の群特異的プライマーも適当である。

プライマー	SEQ ID NO:	性質	反応
RAP05	SEQ ID NO: 312	G (S)	5'-CCCTCAGCTGTAACTCTTCACCA
RAP06	SEQ ID NO: 313	V (S)	5'-CCCTCAGCTGTAAAGCTCTCCACCA

図12

DRB2段階タイピングキット

ここに記載されるキットは、可能な限り多数のタイプを法的に同定するために設計されたものである。プライマーおよびプローブは、逆ドットプロットフォーマットにおいて、DRB1およびDR81対立遺伝子座の迅速な、しかしながら完全なタイピングを提供するために設計される。DR81対立遺伝子座における金46+対立遺伝子およびDR83対立遺伝子座の3個の対立遺伝子の完全な集団を構成するために、2段階検査を使用する。第一段階は、全サンプルの DRB一般プライマー、DRB27(SEQ ID NO: 105) およびDRB28(SEQ ID NO: 108) による増幅である。得られた PCR産物を13プローブのストリップに対してスクリーニングし、これで対立遺伝子特異的増幅、および第二段階のスクリーニングが必要か否かが決定される。

増幅およびハイブリダイゼーションは例9と同じ様に行う。DRB一般的増幅からの増幅産物は、DRB1対立遺伝子座の第一可変領域に特異的な8つのプローブ、3つのDRB3対立遺伝子座(52a, 52b, 52c)に特異的な4つのプローブ、および1つのコントロールプローブを含有するプローブペアに対してスクリーニングする。3つの対立遺伝子を有し、DR2/DR4タイプに見出されるDRB5対立遺伝子座をターゲティングするため、このストリップにさらにもう1つのプローブを付加することもできる。認識される特異的ハイブリダイゼーション領域およびタイプを以下に掲げる。

特種平6-505625 (20)

設置されるタイプ	接続部品
DR1	WLF
DR2	WPX
DR3, 5, 6	YSTS
DR4	VH
DR7	OYK
DR8, 12	Y3TG
DR9	KDF
DR10	EV
52a	LRS
52b, 52c	LLS
52b	設計中
52d	設計中
電	TELCON

IRB3タイプはこの検定の結果から決定され、この検定の結果に基づいて、どちらの対立遺伝子特異的増幅(ASA)を行う必要があるかを決定する。サンプルのタイミングに最も必要なものは2つであるが、6つの異なるASAを提供する。同じく3'プライマー、AB60はたとえは、すべての5つのASAに代えて使用でき、通常キット中に加えられる成分に含まれる。5'プライマーによって、増幅特異性が付与される。各5'プライマーによって増幅される IRB3タイプおよび架橋されるエピトープを以下に掲げる。プライマー2、3および4が設計され、広範囲に試験され、上記実施例で説明した。

増幅されるタイプ ハイブリダイゼーション配列

DR1	WLF
DR1	WPR
DR3, S. 6	YSYS
DR4	VH
DR8, 12	YSYD

第二段階は、ASAからの増殖産物の5つのタイプを可能にする一連のプローブに歸する。実施概要においては、すべてのプローブを同一のストリッピング付着させ、この同一のストリッピングを ASAからの生成物のタイプに使用する。以下の説明に従事的なプローブが ASAの結果のタイプに十分である。

区域 **エピトープ**
 57-60 DAE, S, E, A-H, V-S
 67-74 R, I-DE, I-A, F-DR, DR, KQZ, K, R-BRR-E, F-DR, I-DR, I-DR, DR-L

「おのれ」の個性的な形は自人のMCでは慣れてゐる。しかし

「その他」の語彙のタクシードルは日本語で可視化することも可能である。これらの位置の重要性は非白人集団のタイピング也可能にすることである。これらの位置における他のプローブを、ヘテロ接合体対ホモ接合体の接觸における不規則性の解決のために、包きさせることもできる。

卷四

1989対立遺伝子セットに含まれない対立遺伝子

DRAI-03D3 IS00 21 NOV 61 ** *** *** *** *** TAG SET AGC KCT GMN
TUT CAT TIC TIC AAT GCG ACC AGC GAA CAA TAC TGT CCG TCC GCG AGA NAA TAC GMN
CAT AAC CAG CAG GAA AAC GCG CCG TCC TGC AGC AGG CAA GAG GAA GAO TAC CGG
GGG CGG AGG GAG CCG CGG CGG CGC GAA GAC GCG GAG TAC TGC AGC AGC CAG AAG
GAG CTC CTG GAG CAG AND CGG CGG CGG GAA TAC TGC AGC AGC TAC TGC AGA GAC AAC
GAG GCA GAA GAC AGC TGC AGA GCA GTC CGA CGG CGA

CRM1-B408 (520 bp NCBI 15): CA CGT CTC TCG GAG CAG TGT AAA CAT GAT
TGT CAT TGC TCG AAC GCG AGG AAG GAA CGG TCG EGG CGG TCA CGG AGA TAC YTC
TTC GAC CAA TAA GAG GAA CGA CGT CTC TCG GAG AGC GAC CGG GGG GAG TAG CGG
GCG GTC AGG GAA CGT CGG CTC AGC CGG CGG GAG TAC AAC AGC CGG AAG
GAC CTC CGG GAG CGC TGT CGG CGC CGG CGG AAC TGC AAC ACC CGG TCG TCC AGA AAC XAC
TTC CGG CGT CGG AAC AGC TGC AGA CGG CGA CGG CGG CGA

DNA1-0410 (SEQ ID NO: 15) : CA CGT TTT GTC GAG CGC GTT AAC GAT CTC
TGT CGT TTC ACG GGG AGG CAG GAA CGG TCC TGT CGC AGA TGC TGC
TAG CAG CAA GAG GAA TCA GGG CGC TGC TAC AGG GAG GAG BGA GAG TAC CGG
GGG GTC AGC GAG TCC GGG CGC CCT AGG GAG TAC TGA TAA AGC CAG AAC AGG
GAG GTC ATG GAG AGG CGG CGG AGC GCA GTC GAG CGC TAC TGC AGA CGC AAC
TAC GGG GTC CGG GAG CGC TAC AGC GTC CGG CGG CGA

DNA1-1403 [880 bp NO: 391] CA CGT TTC XTG CGG TAC TGT AGG TCT GAG
TGT CAT TGC TCG AAC GGG AGG DAA CGG TCA CGG TGT CCG TAC GAG
CAT AAC CGG DAA GAG CGG TGT CGG TGT TCC GAC AGC GAG GGG GAG TAC
CGG CGG AGG GAG CGG TGT CGG CGT GAT GGC GAG TAC TGG AGC AGC CAG AGG
GAG CGT CGT GAA GAG AGG CGG CGG CGG TGT TCC GAC TAC TGG AGA CAC AGC AGG
TAC CGG GGT GAT GAG AGC TCT ACA ATG CGG CGA CGA CGA

SNAIL-1883 (SNQ ED NOV 141) CA GOT TIC CTR TICU CAG GATC AAG AGG CAG
TGT GAC TGC TCC AAC GGG AGG GAG GAG GTC GAA TCC TCC GAG GAC TAC
TAT TAC CAG GAG GCG TGA CCC TCT GAT AAG GCA GTC GAG GAT TAC
GNG GNTI AAG GAG CTC AGG GAT CTC TAC GGT TAC TAC TAC AAG AAT CAG
TAC GAC CAG GAG GAT GAG GAG GGT GAT GAG GAT TAC TAC AAG CAG AGC
TAC GGT TAC GAG AGG TAC ACA GTC DAD CAG HSA

DAB110711 (HQ ID No: 17): CA GTC TGC TTC AAC GAG CCT AAA GAC CAG
TGT CAT TCC TCT AAC GGG AGG GCG CGG CGG TGC GCA AAC AAG TAC TGC
TAC AAC GAA GAG TCC CCT CCC TCC GAT AGC GCA GTC GAG GAG TAC CGG
GCC GTC AGG GAG GTC GGG CGG CCT AAC GCC GAG TGC TGG AAC AGC CAA AAC
GAC CTC TTTG GAG TGG AAC AGG CGG GAG GTC GTC AAC AGC TAC TGG AAC CAA AAC AAC
TAC GCG TTA GTC GAA AAC TCC ACA GTC GCA GCA CGG CGA

DHNL1#0804 (SEQ ID NO: 23): GAT CGT TGC TGG GAG TAG TCG AGC GGT GAG
TGT TCC TGC ATG GAA AGG GAG TGG CCG CCG TGC CCG GAC AGG TAC TGC
TAT AAC GAA TGG GAG TGG GCG TGC TGG GAC AGG GAG GGG GAG TGC CGG
GCG UUU AGT GAG GAG CGG CGG CCT GAT GTC GTC TGC TGG GAC AGG GAC CAC
GCG TGC CTC GAA GAG GAG CGG CGG GCG GCG GAG GAC AGG TAC TGG AGA AAG
TAG TGG GAG GAG CGG AGG TCA AGA GTC GAG CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA

DNA STRANDS (KMP 10 MM): 3H1: GA CGT TGU TGU GAG TGC AGG GOT GAG
TGT CAT TGC TAC GAG AGC AGG GCG GAG GAT GCG TAC TGC
TAT AAC GAA GAG TCC TGA CGC TGC TAT AGT AAC GCG GGG GAC TGC CGG
GAC GCG AGC GNG CAA GCG DCA CCT GAT GAG GAG CAA TGC TAC AAC CAC AAC
AAC TGC CTC GAG GAC AGG FGG GCG GCG GAT AAC YGG TCC AGA AAC CAC AAC
TAG DCA GTC AGT GAT TGC AGC AAC GCG EGA

0001+1202 [SEQ ID NO: 33] CA CGT TTC ATG AGG TAC GCT AGC GAT GAG
TGT ATT TAC TTC ATG AGG AGG CGG GAG GCG TGA CGG AGA CTC GCG
GAT AGC GAG GAG CGG GTC GTC CGC TGC GAC AGC GTC GGG AGC TTC CGG
GGG GTC AGC WGG GAA GCA GCG GCG GCG CCT GTC GTC GTC AGC AAC GAC GAG
GAC TAA CTG GAA GAC AGC CGC GCG GCG AGC GTC AGC AGG TAT TGC AGA CTC AGC
TAC GCG AGT GTC GAA AGC TGC TCA GTC GTC GCG CGA CGA

DNA21-1304 (HQ) 69 NH: 3811 DA GGT TCC VTC DGG TAC TCG RGG TCT GGG
TGT GAG TGC TGC AAC GGG AGG AGG CCG GAA TGC CGG AAC TAC GGG
TAT AAC CAM GAG TCG TGC CTC TGC TAC TGC GGG GGG AAC TGC CGG
RGG GGG AGG GNG TGG GAG TGG CCT AAC GCG GAG TGG TGG AAC AGG CAM AAC
GAG ATC GTC GAA GAC GAG CCT GGG TGG GAC GAG TCG TAC AGA AAC AGC AAC
GAC TGT GTC GAG AAC TGC ACG GTC GGG CGA CGA

FIG. 1

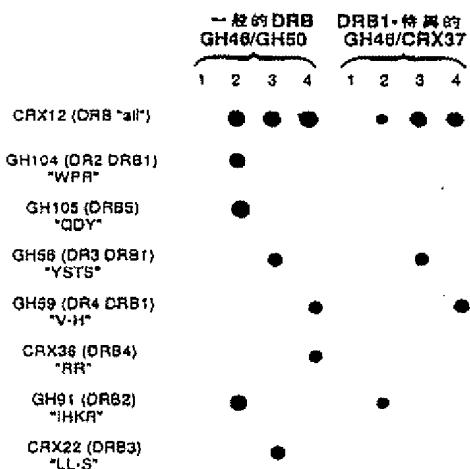


FIG. 2

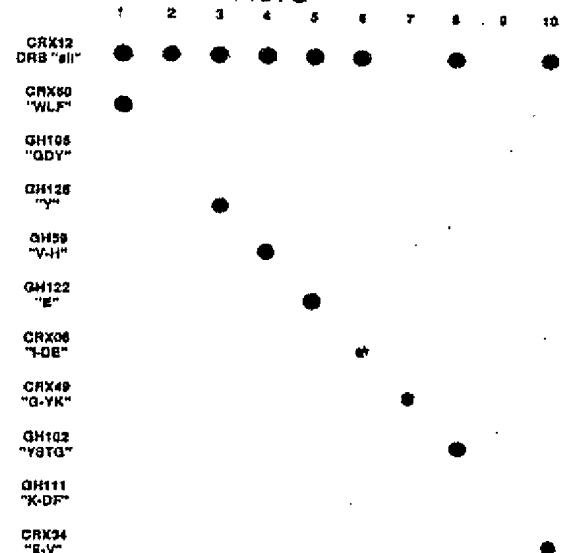


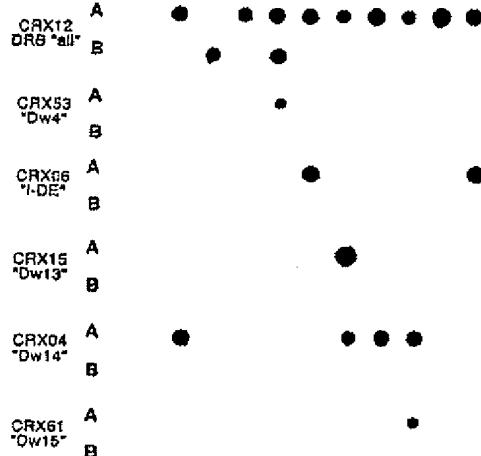
FIG. 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

CRX12
DRB "all"CRX50
"WLF"GH105
"QDY"GH125
"Y"GH59
"V-H"GH122
"E"CRX06
"I-DE"CRX49
"G-YK"GH102
"VSTG"GH111
"KDF"CRX34
"E-V"

FIG. 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



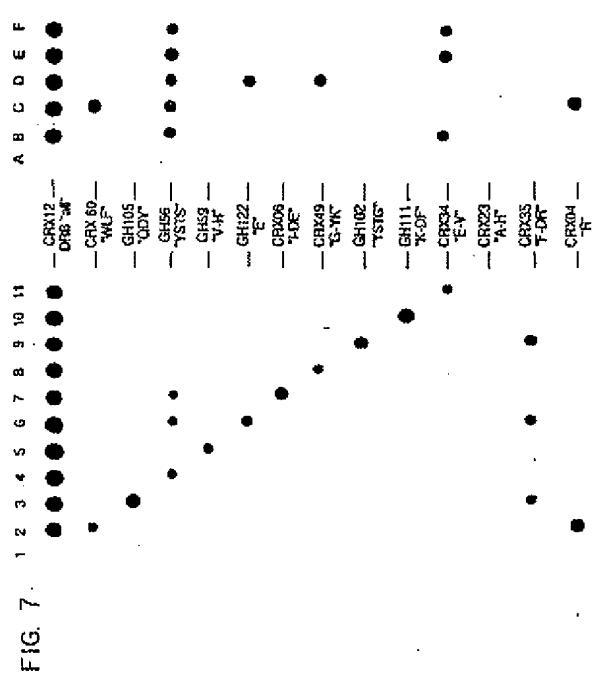
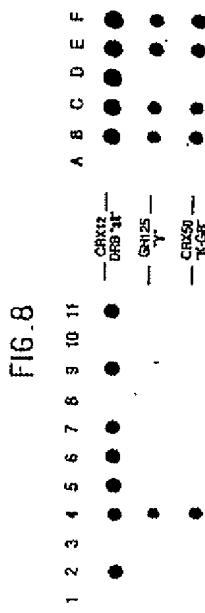


FIG. 5

	GH129	CRX60	CRX55	CRX64	CRX63	CRX65	CRX67	CRX68	CRX69	CRX70	CRX71
QNL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RSN											
SPGNO											
TERUE											
KOKE											
SIE											
THAG											
ANALA											
BAP											
ARC											
STL											
TAN											

FIG. 6



#	CROSS K-L-F	SUS G-B-Y	G125	CROSS K-SR	G122 Y-X	CROSS A-H	CROSS G-X	CROSS Y-Z	CROSS E-F	CROSS F-G	CROSS E-H	CROSS G-X	CROSS Y-Z	CROSS E-F	CROSS F-G	CROSS E-H	
555	*				*												
595						*											
634							*										
766								*									
812								*									
863								*									
PS5									*								
2025									*								
2145									*								
2590									*								
2671									*								
2755									*								
										*							

FIG. 9A

#	CROSS K-L-F	SUS G-B-Y	G125	CROSS K-SR	G122 Y-X	CROSS A-H	CROSS G-X	CROSS Y-Z	CROSS E-F	CROSS F-G	CROSS E-H	CROSS G-X	CROSS Y-Z	CROSS E-F	CROSS F-G	CROSS E-H	
555																	
595																	
634																	
766																	
812																	
863																	
PS5																	
2025																	
2145																	
2590																	
2671																	
2755																	

FIG. 9B

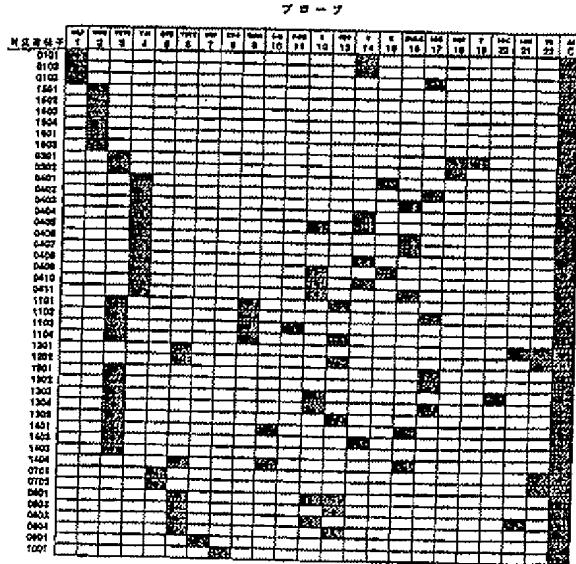
Figure 10
ORBT タイプパターン

Figure 11

Figure 11

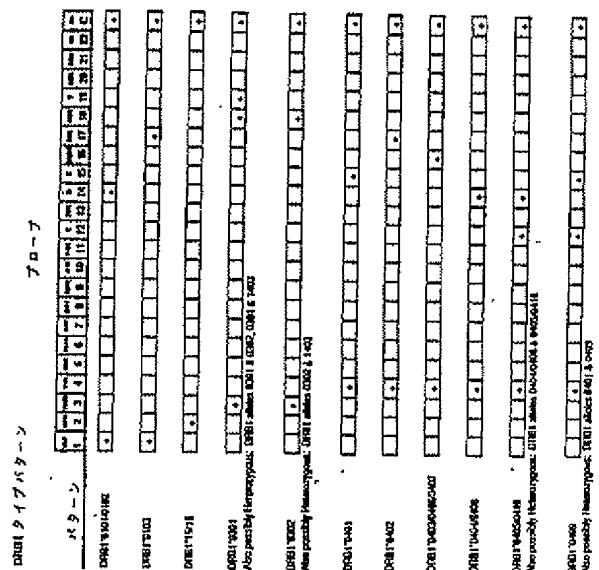
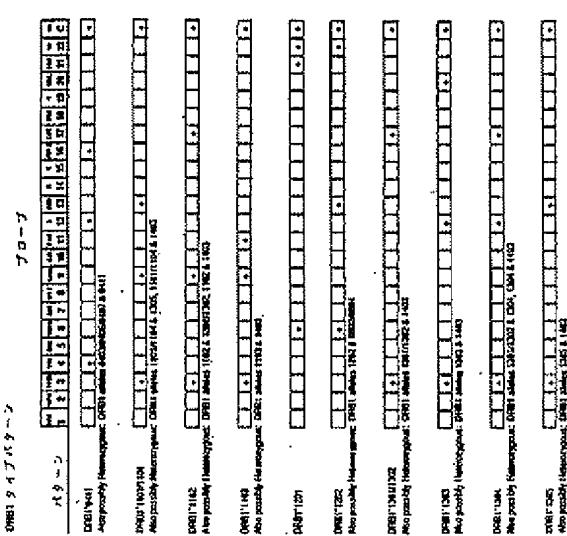
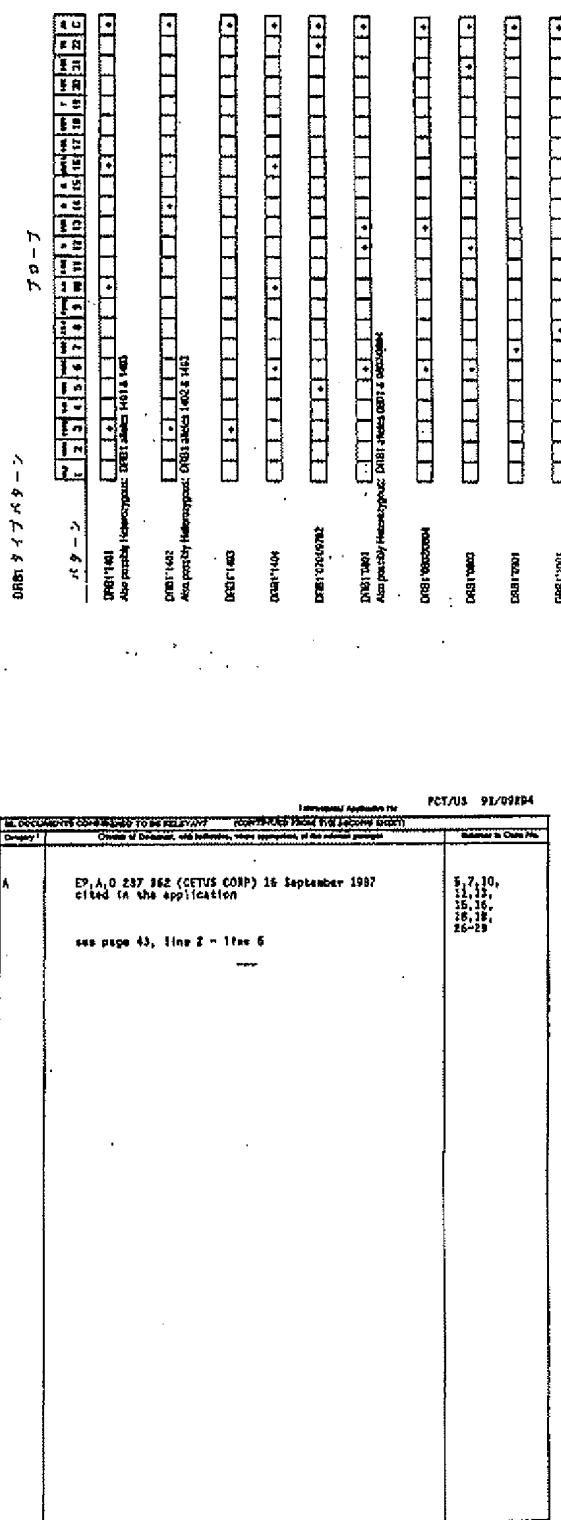


Figure 13

January 12



I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/US 91/09294	
(Article 19 International Patent Classification (IPC) or in Unit Request Classification and CFC)			
(Int.Cl. 5 C10B1/68)			
4. NAMES SEARCHED		Invention Searchability Analysis ^a	
Classification System		Classification System	
Int.Cl. 5 . . . C10B		C10B/00	
Documentation Standard Value (See International Documentation for the latest and most accurate information in the Patent Gazette)			
5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ^b			
Category ^c	Character of Document ^d	Textual References, where appropriate, of the relevant portions ^e	Document ID Code ^f
X	WO,A,B # 81 547 (CETUS CORP) 30 November 1989 see claim 1	—	1,2
X	DNA-MONOGENETICS vol. 30, September 1989, NEW YORK US pages 203 - 213; L. FUGGER ET AL.: "Typing for HLA-DRB1*03 and HLA-DPB1*06 by sequence-specific DNA <i>in vitro</i> amplification and allele-specific oligonucleotide probes. Detection of "new" DPB1*06 variants" see the whole document	—	1,2
A	WO,A,B 901 673 (CETUS CORP) 1 June 1990 see page 44, line 14 - line 19	—	3,4,7, 10,11, 12,24, 28,29
—			
^a Standard categories of cited documents. ¹⁰		^b Each document, regardless of the extent of its relevance, will be designated using one or more of the following codes:	
^c Annexes defining the general nature of the art which it is considered to be of particular interest.		¹⁰ Both domestic, published prior to the international filing date of the application, and not yet granted, PCT or national patent applications, and also publications, which may be relevant to the application.	
^d Annexes for publication or for other international search purposes only.		¹¹ International patent applications, which have been filed directly or through a national office, and which have been examined or published outside of the country in which they were filed.	
^e Annexes which may contain specific patent claims, or parts of such claims, which are not included in the main body of the document, but which are nevertheless essential to an understanding of the document.		¹² International patent applications, which have been filed directly or through a national office, and which have been examined or published outside of the country in which they were filed.	
^f Annexes which contain the names of the inventors, the addresses of their places of residence, and the names of the assignees or patent agents.		¹³ International patent applications, which have been filed directly or through a national office, and which have been examined or published outside of the country in which they were filed.	
¹⁰ Annexes which contain the names of the inventors, the addresses of their places of residence, and the names of the assignees or patent agents.		¹⁴ Annexes containing the text of the relevant patent family.	
6. PARTICIPATION			
Date of the First Examination Committee of the International Search		Date of Publishing in the International Search Report	
07 APRIL 1992		25.04.92	
International Searching Authority		International Examining Authority	
EUROPEAN PATENT OFFICE		MOLINA BALAH E. ✓	



国際検査報告

US 9109294
SA 66499

This notice lists the patent family members relating to the present document filed in the International Standardized search report.
The numbers are equivalent to the European Patent Office EPO. No. or
The European Patent Office is at your service for more particular details are easily given for the purpose of information. 07/04/92

Patent document cited in current Report	Publishing Year	Patent family members(CC)	Publishing Year
WO-A-8813587	88-11-08	AI-A- 3690489 EP-A- 0437160 JP-T- 3504128	12-12-88 22-01-91 26-09-91
WO-A-8901875	89-01-08	EP-A- 0439458	07-08-91
EP-A-0237362	87-09-17	AI-B- 691119 AI-A- 6916237 EP-A- 0459532 EP-A- 0459533 JP-A- 6221435	01-03-90 17-09-97 04-12-91 04-12-91 21-09-97

For more details about this notice, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/92

フロントページの続き

(72)発明者 ブガウン, テオドリカ

アメリカ合衆国94579 カリフォルニア州
サン リードンロ, ファリス ストリート
15524

(72)発明者 グリフィス, ロバート エル.

アメリカ合衆国94002 カリフォルニア州
ペルモント, オーク クノール ドライブ
1820

(72)発明者 シャーフ, スチーブン ジェイ.

アメリカ合衆国94709 カリフォルニア州
パークレー, フランシスコ ストリート
2028-1 / 2

(72)発明者 アップル, レイモンド ジェイ.

アメリカ合衆国94116 カリフォルニア州
サン フランシスコ, トウェンティーセカ
ンド アベニュー 2622

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

〔部門区分〕第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)8月18日

【公表番号】特表平6-505625

【公表日】平成6年(1994)6月30日

[年通号数]

【出願番号】特願平4-502862

【國際特許分類第6版】

C120 1/68

[E II]

C120 1/68 A

手 級 補 正 卷

平成 10 年 2 月 25 日

新許寧集

1. 章件の表示

华成 4 年级数学

会員登録
会員登録番号: 100-0001
会員登録名: 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング 331
電話番号: (3211) 3651 (代表)
氏名: (6669) 桃村 順

4. 简正对集古题名

明治書院

5. 植物种类项目名

請求の範囲

6. 総括の内容

五〇六

71), CRX45 (SEG 10 NO:74), GH102 (SEG 10 NO:89), GH111 (SEG 10 NO:92), CRX34 (SEG 10 NO:70), CRX46 (SEG 3 NO:60), GH88 (SEG 10 NO:88), CRX69 (SEG 10 NO:84), および CRX-2 (SEG 0 NO:53)からなる群より選ばれる 2 種またはそれ以上の
プローフからなる「精緻化 4」を次のように定義する。

「6. オリゴ又クレオチドプローブの選定のパネルは、プローブ ID: 25(SEQ ID NO:14), CX05(SEQ ID NO:6), CX03(SEQ ID NO:7), CX15(SEQ ID NO:5), CX02(SEQ ID NO:8), CX09(SEQ ID NO:2), CX01(SEQ ID NO:6), CX54(SEQ ID NO:35), CX07(SEQ ID NO:17), CX57(SEQ ID NO:76), および CX12(SEQ ID NO:69)からなる。各導入する選択する2種類を並びそれ以上のプローブからなる「測定用PCR検査のための選

7. 工程(1)において用いられるプライマーは GH46650 (IC NO:17) および GH56650 (ID NO:69) であり、工程(4)において用いられるプライマーは GH46650 および GH37650 (ID NO:10) であり、オリゴヌクレオチドドライ一プの第一のベースは GATプロトコル (ID NO:72) GH006 (SEQ ID NO:91), GH014 (SEQ ID NO:92), GH039 (SEQ ID NO:93), GH045 (SEQ ID NO:94), GH122 (SEQ ID NO:93), GH223 (SEQ ID NO:95), GH343 (SEQ ID NO:96), GH413 (SEQ ID NO:97), GH502 (SEQ ID NO:98), GH115 (SEQ ID NO:99), GH344 (SEQ ID NO:100), GH244 (SEQ ID NO:100), GH065 (SEQ ID NO:106), GH303 (SEQ ID NO:104), および CTG12150 (ID NO:23)からなり、オリゴヌクレオチドドライ一プの第二のヌクレオチドは プロトコル (ID NO:63) および GH46650 (ID NO:66), GH333 (SEQ ID NO:76), GH150 (SEQ ID NO:101), GH062 (SEQ ID NO:101), GH063 (SEQ ID NO:80), GH064 (SEQ ID NO:80), GH066 (SEQ ID NO:77), GH067 (SEQ ID NO:70) および GH002 (SEQ ID NO:69)からなる。[第4項2] 装置の発明

（b）オリゴスクレオチドプローブの第一および第二のバネは基体支持体に固定し、各プローブは上記支持体上の分離した別々の位置に配色される（請求項1、特許公表）。

9. 工場 (4) おみび第数 (6)において用いられるプライマー、ならびにシリコンオキシオチドプローブの第 および第二のパネルからなる「構成部」を記載の方をも取扱ふことを特許請求項とする。

19. ブライマー 3619(SEQ ID NO:62)、6650(SEQ ID NO:63)、および 6733)

リタイスする方法

13. 増幅工場はブライマー・GM4をより良いID:0とのボリミーラーゼ強度反応によって行い、プロンのノイズは CRX(ID:05) ID: NO:79 , CRXNS(ID:05) ID: NO:81 , GH104 (ID:19 NO:80), GH68 (ID:80) ID: NO:67 , CRXNS (ID:05) ID: NO:61 , GH122 (ID:05) ID: 59 , GH623 (ID:05) ID: NO:66 , CRXNS (ID:05) ID: NO:71 , UX49 (SE05) ID: NO:74 , GH102 (ID:05) ID: 69 , GH117 (SE05) ID: NO:92 , UX42 (SE05) ID: NO:70 , CRX4 (SE05) ID: NO: 50 , GH68 (SE05) ID: NO:60 , CRXNS (SE05) ID: NO:64 , よりも CRX12 (SE05) ID: NO:63 がわかるより測定される 2 種またはそれ以上のプロ フからなる「構成段12」は前の方は

14. サン・ブリガード立派伝子0101. 0102. 0103. 0301. 0302. 0401. 0402. 0403. 0404. 0405. 0406. 0407. C408. 0701. 0801. 0802. 0903. 0901. 1001. 1101. 1102. 1103. 1104. 1201. 1301. 1302. 1303. 1401. 1402. D26. DF7. FEV. 分からぬ群より選ばれる0010立派伝子からの情報を含むするか否かを決定し、その結果が出来上がる立派伝子を表示する方法として、

(e) サンプル中のO₂濃度を増幅し、ついで

(b) 工程(b)で選択された上記種類をオリコメシケオチドプローフのどちらとこれらのプローフが10ヌクレオチドを越える正確に活性性の範囲とのみハイブリダイズするような条件下的ハイブリダイズさせる方法

16. オリゴヌクレオチドグローブのパネルは、プローフCRX04(SEQ ID NO:80), CRX05(SEQ ID NO:81), CRX15(SEQ ID NO:84), CRX23(SEQ ID NO:85), CRX34(SEQ ID NO:86), CRX35(SEQ ID NO:87), CRX36(SEQ ID NO:88), CRX37(SEQ ID NO:89), CRX38(SEQ ID NO:90), CRX39(SEQ ID NO:91)。

(SEQ ID NO:73)、フロープ CRX60(SEQ ID NO:78), GH105(SEQ ID NO:81), GH104(SEQ ID NO:80), GH98(SEQ ID NO:57), CRX05(SEQ ID NO:81), GH122(SEQ ID NO:83), CRX23(SEQ ID NO:88), CRX35(SEQ ID NO:77), CRX49(SEQ ID NO:10); CRX02(SEQ ID NO:59), GH111(SEQ ID NO:92), CRX34(SEQ ID NO:70), CRX04(SEQ ID NO:80), CRX05(SEQ ID NO:89), CRX68(SEQ ID NO:80); CRX12(SEQ ID NO:88)からなるがより構成される2種またはそれ以上のオリゴヌクレオチドフロープ、ならびにフロープ CRX125(SEQ ID NO:84), CRX8C(SEQ ID NO:80), CRX93(SEQ ID NO:78), CRX15(SEQ ID NO:64), CRX82(SEQ ID NO:81), CRX83(SEQ ID NO:89), CRX61(SEQ ID NO:80), GH54(SEQ ID NO:55), CRX65(SEQ ID NO:77), CRX57(SEQ ID NO:78)、およびCRX12(SEQ ID NO:63)からなるがより構成される2種またはそれ以上のフロープが異なる「請求項1」記載のギット

11. ブライマー G-148(SEO ID NO:67), SH60(SEO IC NO: 58), および CRX57(SEO ID NO: 73), ブローパー CX93(SEO ID NO: 70), CH05(SEO ID NO: 80), CH14(SEO ID NO: 81), CRX59(SEO ID NO: 67), CRX08(SEO ID NO: 61), CH12(SEO ID NO: 53), CRX23(SEO ID NO: 60), CRX31(SEO ID NO: 71), CX048(SEO ID NO: 74), CH105(SEO ID NO: 60), CH117(SEO ID NO: 92), CRX24(SEO ID NO: 79), CX040(SEO ID NO: 60), CH65(SEO ID NO: 88), CRX08(SEO ID NO: 84), および CX12(SEO ID NO: 63)からなる。一方、これらのリバースペクタクレーティドプローフ、ならびにノローハイドセクション(SEO ID NO: 94), CX06(SEO ID NO: 83), CRX53(SEO ID NO: 67), CXR16(SEC ID NO: 64), CRX29(SEC ID NO: 87), CRX55(SEO ID NO: 82), CX081(SEO ID NO: 80), CH34(SEU J NO: 83), CX046

(SEQ ID NO:7), D85X (SEQ ID NO:70), および D85X (SEQ ID NO:80) からなる第二のペプチドのオリゴヌクレオトイドプローフラジオ「抗体原10」認載のキット。
12. サンプルが B1, B2, B3, B4, B5, および B6 にタイプからなるより若はより白血病の ABL 酶活性子からの核酸ひらなるり否否を判定する方法これ以

4. 本研究の貢献と課題

(6) 仕立て：本標準された上記規格をオリゴ又クレオガードノープのハサミにてこれらノプローブが40又クレオド長を越えるはるに化粧地の配列とのみハイブリダイズするよな是等ノハイブリダスセで、この基準上記ノプローブは的確に選択子ニクリンノのソルノ規格より～16をコードする既存の多形規格ノハイブリダイズする。

I8EC 10 HQ:70, CRX65(SEL 10 HQ:77), CRX57(SEL 10 HQ:70), CRX60(SEL 10 HQ:70), CRX41(SEL 10 HQ:80), CRX62(SEL 10 HQ:81), CRX63(SEL 10 HQ:82), CRX64(SEL 10 HQ:84), G-54(SEL 10 HQ:85), CRH6(SEL 10 HQ:86), GH19(SEL 10 HQ:87), GH102(SEL 10 HQ:89), GH103(SEL 10 HQ:91), GH111(SEL 10 HQ:92), GH122(SEL 10 HQ:93), および GH125(SEL 10 HQ:94)からなる「高音部第15」記録の方法

12. サンプルの回路DR型が DR10A1, DR10w¹DRN, DR2, DR4Dk4, DR4W, DR4WN, DR4WN2, DR4D414, DR4DN15, DR3, DRM1, DRW, DRW1, 1, DRW1, 2, DRK12, DRW8, 3, DRW13, DRW14, DRW14HGS, DR7, DRW1, 1, DRW3, 2, DR8 および DR10タイプからなる群より選ぶ。それらの動作性能を決定する方法について。

(a) サンプル中のMRB1核酸を増幅し、ついて

④ T様(6)で培養された上記細胞をオリゴヌクレオチドブリーフのバトルとこれらのブリーフが10メガオヘド濃度を越える正確に相補性の配列との組合せでライプする方法

18 オリジンクレオドプローブのパネルは、ブコープCRX04 (SE0 10 NO:60), CRX06 (SE0 10 NO:10), CRX07 (SE0 10 NO:69), CRX14 (SE0 10 NO:70), CRX15 (SE0 10 NO:71), CRX16 (SE0 10 NO:74), CRX19 (SE0 10 NO:76), CRX50 (SE0 10 NO:79), CRX83 (SE0 10 NO:82), CHN65 (SE0 10 NO:86), GH59 (SE0 10 NO:87), GH102 (SE0 10 NO:89), GH105 (SE0 10 NO:91), CH111 (SE0 10 NO:92), およびCH112 (SE0 10 NO:93) が含まれる。これらのうち、2種類のアレイチップ上のブコープが組み込まれる。

例) カラーマルチ用の墨水を多く使ったときに、エコノミーモードを実行する方法

1. オリジンコレオドライブのパネルでは、プロ プロモーション(10 NO.60)
CX9545 (SEL ID NO.01), CX923 (SEL ID NO.60), CX936 (SEL ID NO.30), CX937 (SEL ID NO.31), CX946 (SEL ID NO.74), CX935 (SEL ID NO.78), CX950 (SEL ID NO.79),
CX9368 (SEL ID NO.82), G105 (SEL ID NO.88), GH595 (SEL ID NO.97), G102 (SEL ID NO.93), GH575 (SEL ID NO.91), G112 (SEL ID NO.92), エコノミーモード (SEL ID NO.95)

22. 第一のアノールのブロープは、#R601(SEQID NO: 79)、#P104(SEQ ID NO: 94)、#R846(SEQID NO: 123)、#R348(SEQ ID NO: 126)、#R297(SEQ ID NO: 128)、#R102(SEQ ID NO: 169)、#R282(SEQ ID NO: 185)、#R620(SEQ ID NO: 193)、#R102(SEQ ID NO: 178)、#R6012(SEQ ID NO: 198)、#R607(SEQ ID NO: 194)、および#R608(SEQ ID NO: 195)からなるおよびこれらを組み立てる以上とのブロープからなる「酵素標1」
試薬の方法

23. 第二のパネルのプローブは、(N06223(SE010) N0:228), DR837(SE010) N0:1440, DR828(S) SE010 N0:275, DR818(S) SE010 N0:2381, DR818(SE010 N0:134), DR802(S) SE010 N0:51, DR836(SE010 N0:115), DR829(SE010 N0:268), DR828(SE010 N0:308), DR816(SE010 N0:212), DR815(SE010 N0:214), およびDR834(D) SE010 N0:182。これらを組み合わせたものが以下に示すプローブからの
「説明第1」記載の内容。

ス、工具 (b)ににおいて用いられるプライマーは、CRX28 (SE0 IC NO:07) および CRX28 (SEC 10 NO:03) であり、上記 (c)ににおいて用いられるプライマーは CRX28 (SE0 IC NO:01) であり、(d)に於ける各ノードのパネルは、CRX28 (SEC 10 NO:03) であり、オーリゴヌクレオチドプライマーの各ノードのパネルは、プローブ CRX28 (SEC 10 NO:75), CRX14 (SEC 10 NO:30), CRX26 (SEC 10 NO:12), CRX28 (SEC 10 NO:125), CRX28 (SEC 10 NO:280), CRX28 (SEC 10 NO:137), CRX28 (SEC 10 NO:169), CRX28 (SEC 10 NO:180), CRX28 (SEC 10 NO:170), CRX28 (SEC 10 NO:169), CRX28 (SEC 10 NO:184)、および CRX42 (SEC 10 NO:119) からなり、オリゴヌクレオチドノードの各ノードのパネルは、プローブ CRX229 (SEC 10 NO:229), CRX37 (SEC

CRXG5(SEQ ID NO:61), CRXG7(SEQ ID NO:78), CRXG6(SEQ ID NO:79), GRN59(SEQ ID NO:87), およびCRXG35(SEQ ID NO:60), CRXG4(SEQ ID NO:30), CRXG6(SEQ ID NO:60), CRX7(SEQ ID NO:78), DRX818(SEQ ID NO:257), CRX58(SEQ ID NO:77), GRH102(SEQ ID NO:89), GRH145(SEQ ID NO:69), CRXG3(SEQ ID NO:32), CRXG4(SEQ ID NO:71)からなる組より選択される「抗体群1」を製造する方法。

22. 下程 (2)において用いられるプライマーはG010 (SEQ ID NO:67)およびG150 (SEQ ID NO:102)であり、上程 (2)において用いられるプライマーはA693 (SEQ ID NO:92)とA690 (SEQ ID NO:57)、AR92 (SEQ ID NO:58)とA693、A644 (SEQ ID NO:56)とA690、およびC146 (SEQ ID NO:93)とC007 (SEQ ID NO:103)からなるか又はそれより派生され、オリゴヌクレオチドプローブの第一のペアはプローブ CRX33 (SEQ ID NO:60)、CRX34 (SEQ ID NO:69)、CRX35 (SEQ ID NO:85)、CRX9 (SEQ ID NO:87)、CRX9 (SEQ ID NO:70)、CRX11 (SEQ ID NO:82)、ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX12 (SEQ ID NO:93)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、CRX23 (SEQ ID NO:86)などである。CRX08 (SEQ ID NO:81)、CRX25 (SEQ ID NO:71)、CRX53 (SEQ ID NO:54)、およびCRX62 (SEQ ID NO:80)からなる群に於ける2番目またはそれ以上のペア-2からなり、第二のペア-2のペアは既述のCRX33 (SEQ ID NO:60)から派生されるも構成またはそれ以上のプローブからなり、第三のペアは既述のCRX14 (SEQ ID NO:80)、CRX35 (SEQ ID NO:104)、CRX113 (SEQ ID NO:101)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX57 (SEQ ID NO:76)、CRX36 (SEQ ID NO:77)、DRB106 (SEQ ID NO:272)、DRB107 (SEQ ID NO:248)、U-0215 (DEC ID NO:201)、およびDRB108 (SEQ ID NO:249) (Pfam ID NO:10_75)、H0125 (DEC ID NO:94)、DRS180 (SEQ ID NO:1260)、DRK122 (SEQ ID NO:59)、DRX01 (SEQ ID NO:80)、CRV23 (SEQ ID NO:169)、CRX08 (SEQ ID NO:91)、DRX02 (SEQ ID NO:81)、CRX65 (SEQ ID NO:84)、CRX35 (SEQ ID NO:73)、CRX04 (SEQ ID NO:80)、CRX57 (SEQ ID NO:79)、CRX67 (SEQ ID NO:74)、CRX04 (SEQ ID NO:95)、CRX5 (SEQ ID NO:90)、CRX64 (SEQ ID NO:83)、DRX01 (SEQ ID NO:60)、CRX15 (SEQ ID NO:24)、CRX06 (SEQ ID NO:61)、CRX57 (SEQ ID NO:76)、CRX9 (SEQ ID NO:77)、DRX09 (SEQ ID NO:87)、以及CRX33 (SEQ ID NO:89)、CRX04 (SEQ ID NO:86)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、CRX27 (STC ID NO:86)、CRX101 (SEQ ID NO:267)、CRX50 (SEQ ID NO:72)、GP102 (SEQ ID NO:89)、DR54 (SEQ ID NO:88)、DRX08 (SEQ ID NO:82)、CRX5 (SEQ ID NO:71)からなる群より派生され、第一のペア-1と第二のペア-1

10 NO:140], DR8208 (SEQ ID NO:279), DR8183 (SEQ ID NO:239), DR8181663 (NO:10 NO:184), DR8028 (SEQ ID NO:67), DR8388 (SEQ ID NO:116), DRB222 (SEQ ID NO:289), DR8232 (SEQ ID NO:905), DR8138 (SEQ ID NO:80), DR8181663 (SEQ ID NO:279), おもじDR10 NO:110; ながらる「請求項21」記載の方法

26. サンルが対立選手院子1C1, 1D2, 0103, 1501, 1E02, 1603, 1B04, 1501, 1B02, 030*, 0302, 0303, 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 1A08, 0405, 0406, 0407, 0401, 0402, 1101, 1102, 1103, 1104, B005, 13C1, 1302, 1303, 1304, 1305, 1301, 1402, 1403, 1404, 1405, G701, G801, 0802, 0803, 0904, 0901, 1001, 1201, および1202ならなる時、¹はそれもW81対立選手院子の候補を有する力が力を決定し、その次段階が由来する対立選手を決定する力次第にあいて、

(a) サンプル中のBIBI核膜を増殖し、ついで
 (b) 工程(1)で培養された上胚珠核膜をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、
 これらのプローブ…が10個ヌクレオチド長を有する反応に特異性の既定のmRNAプローブ
 リダイスするようなるべくヒハイブリダイゼーション方法

26. 第一のバトルモードはCRX33(SE0 ID NO:60),
GHC4(SC0 ID NO:60), GH58(SC0 ID NO:60), GH60(SE0 ID NO:67), CRX49(SE0 ID

67), CX05 SEC ID: A0-710, CX05 SEC ID: IC NO: 860, CX05 SEC ID: NO: E1) からなる
より詳説される事などはそれ以上。ブからなる「技術手帳」1 記載の方法
の二つのプローブのバヌリは第二のプローブのバヌリから詳説される事など
はそれ以上のプローブでなく、第三のバヌリはバヌリ SEC ID: NO: 900,

0R8C3 (SEQ ID NO:140), 0R8I13 (SEQ ID NO:186), 0T085 (SEQ ID NO:70), 0R8E71869

13 NO:79, CRX58(SEC 10 NO:77), 3R8138(SEC 10 NO:272), 3R8139(SEC 10 NO:
270), 3R8136(SEC 10 NO:201), 3R8137,3R8138(SEC 10 NO:282), CRX60(SEC 10 NO:
79), CRX55(SEC 10 NO:94), 03R8100(SEC 10 NO:268), CRX122(SEC 10 NO:037, CRX6
10 NO:00), CRX23(SEC 10 NO:301), CRX62(SEC 10 NO:61), CRX82(SEC 10 NO:
81), CRX83(SEC 10 NO:84), CRX55(SEC 10 NO:71), CRX94(SEC 10 NO:82), CRX87
(SEC 10 NO:78), CRX94(SEC 10 NO:77), CRX122(SEC 10 NO:98), CRX8(SEC
10 NO:99), CRX94(SEC 10 NO:93), CRX94(SEC 10 NO:100), CRX5(SEC 10 NO:64).

29. 工程 (e)において用いられるプライマーはCH40 (SE0 IC NO:67) およびCH30 SE0 IC NO:60)であり、工程 (f)に用いられるプライマーはABCD (SE0 IC NO:13) およびABCD (SE0 IC NO:10) である。ABCD (SE0 IC NO:13) とABCD (SE0 IC NO:10) はABCD (SE0 IC NO:67) とABCD (SE0 IC NO:60) である。ABCD (SE0 IC NO:67) とABCD (SE0 IC NO:60) からなる既存シリアルナンバー。オリゴヌクレオチドプローフの第一のバッフルリポコア (OR03 (SE0 IC NO:10))

32. RAP05(6E2 11 NO:312), 33. RAP03(6E2 12 NO:313)がこれまでの結果より選択されるプロトコル